

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
24 de Junio de 2004 (24.06.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2004/052092 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>:  
A01K 67/027, C12N 5/10, 15/12, 15/63

HERRADOR, Victoria, Eugenia [ES/ES]; Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221, 08041 BARCELONA (ES).

(21) Número de la solicitud Internacional:  
PCT/ES2003/000624

(74) Mandatario: CARPINTERO LÓPEZ, Francisco; Herrero & Asociados, S.L., Alcalá, 35, 28014 MADRID (ES).

(22) Fecha de presentación Internacional:  
9 de Diciembre de 2003 (09.12.2003)

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200202815

9 de Diciembre de 2002 (09.12.2002) ES

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*): LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A. [ES/ES]; Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221, 08041 BARCELONA (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): ZAMANILLO CASTANEDO, Daniel [ES/ES]; Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221, 08041 BARCELONA (ES). MONTOLIU JOSE, Lluís [ES/ES]; Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221, 08041 BARCELONA (ES). LANGA VIVES, Francina [ES/ES]; Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221, 08041 BARCELONA (ES). LAVADO JUDEZ, Alfonso, Javier [ES/ES]; Avda. Mare de Deu de Montserrat, 221, 08041 BARCELONA (ES). TOVAR

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: SIGMA RECEPTOR-DEFICIENT, MUTANT, NON-HUMAN MAMMALS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Título: MAMÍFEROS NO HUMANOS MUTANTES DEFICIENTES EN RECEPTORES SIGMA Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to sigma receptor-deficient, mutant, non-human mammals and the applications thereof. The genome of the endogenous sigma receptor-deficient, mutant, non-human mammal contains a mutation comprising a disruption in a gene of an endogenous sigma receptor, whereby said gene disruption produces a mutant lacking detectable levels of endogenous sigma receptor. The aforementioned mutant can be used as a control animal for *in vivo* studies and as a source of cells to be used in *in vitro* studies. The sigma-1 receptor-deficient mutants can be used as models for the *in vivo* study of central nervous system disorders, memory alterations, stress conditions and drug addiction, neuroprotection and analgesic methods. The sigma-2 receptor-deficient mutants can be used to study diagnostic and therapeutic tools, in order to combat cancer and/or degenerative processes and/or to develop compounds that can prevent, reduce or alleviate the secondary pathology associated with the administration of neuroleptic agents.

(57) Resumen: El genoma del mamífero no humano mutante, deficiente en un receptor Sigma endógeno, contiene una mutación que comprende una disrupción en un gen de un receptor Sigma endógeno, en donde dicha disrupción génica da lugar a un mutante que carece de niveles detectables de receptor Sigma endógeno. El mutante puede ser utilizado como animal control para ensayos *in vivo* así como fuente de células que pueden ser utilizadas en ensayos *in vitro*. Los mutantes deficientes en el receptor Sigma-1 pueden utilizarse como modelos para estudiar *in vivo* desórdenes del sistema nervioso central, alteraciones de la memoria, condiciones de estrés y adicción a drogas, procesos de analgesia y neuroprotección. Los mutantes deficientes en el receptor Sigma-2 pueden utilizarse para estudiar herramientas, diagnósticas o terapéuticas, para combatir el cáncer y/o procesos degenerativos y/o para el diseño de compuestos capaces de prevenir, reducir o aliviar la patología secundaria asociada a la administración de agentes neurolepticos.

WO 2004/052092 A1

## **MAMÍFEROS NO HUMANOS MUTANTES DEFICIENTES EN RECEPTORES SIGMA Y SUS APLICACIONES**

### **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a mamíferos no humanos mutantes deficientes en receptores Sigma endógenos, a células derivadas de dichos animales mutantes, y a sus aplicaciones. La invención también se refiere a un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa útil para la generación de dichos mamíferos no humanos mutantes deficientes en receptores Sigma endógenos.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los receptores Sigma son unos sitios de unión con afinidad por distintos ligandos, algunos de los cuales son fármacos con distinta actividad. Inicialmente, el interés por los receptores Sigma fue debido a su potencial papel en las acciones de los fármacos anti-psicóticos debido a que mostraban elevada afinidad por agentes neurolépticos típicos, tales como el haloperidol u otros compuestos que causan actividad psicomimética, por ejemplo, *N*-alilnormetazocina (SKF-10047). Posteriormente, se ha encontrado que dichos receptores Sigma pueden estar implicados en otros mecanismos fisiológicos.

Se han identificado dos subclases de receptores Sigma, denominadas receptor Sigma de tipo 1 y receptor Sigma de tipo 2, diferenciables por su perfil farmacológico, función y tamaño molecular. Ambos tipos muestran de alta a moderada afinidad por agentes neurolépticos típicos, en particular, haloperidol. Sin embargo, los receptores Sigma de tipo 1 exhiben una elevada afinidad por (+)-pentazocina, (+)-SKF10047 y otros (+)-benzo-morfanos, mientras que los receptores Sigma de tipo 2 muestran baja afinidad por dichos compuestos. Los receptores Sigma de tipo 1 tienen un peso molecular típico de 25 kDa, mientras que el peso molecular de los receptores Sigma de tipo 2 es de 18-21 kDa (determinado en ambos casos por marcaje de fotoafinidad).

#### **Receptor Sigma de tipo 1**

El receptor Sigma de tipo 1, en adelante receptor Sigma-1, es un receptor de tipo no opiáceo, que se expresa en multitud de tejidos adultos de mamíferos (sistema nervioso central, ovario, testículo, placenta, glándula adrenal, bazo, hígado, riñón, tracto gastrointestinal, etc.) y también a lo largo del desarrollo embrionario desde sus fases más tempranas y que, aparentemente, está implicado en un elevado número de funciones fisiológicas. Se ha descrito su elevada afinidad por distintos fármacos, tales como SKF-10047, (+)-pentazocina, haloperidol y rimcazole, entre otros, ligandos conocidos con actividad analgésica, ansiolítica, antidepresiva, antiamnésica, antipsicótica, y neuroprotectora, por lo que el estudio del receptor Sigma-1 es de gran interés en farmacología debido a su posible papel fisiológico en procesos relacionados con la analgesia, ansiedad, adicción, amnesia, depresión, esquizofrenia, estrés, neuroprotección y psicosis [1], [2] y [3]. Sin embargo, el papel real que desempeña el receptor Sigma-1 sigue siendo todavía desconocido y enigmático. De hecho, se desconoce su ligando endógeno concreto, aunque se cree que interactúa con hormonas esteroides endógenas, tales como la progesterona y la testosterona.

Se ha descrito la secuencia de cDNA que codifica para el receptor Sigma-1 en conejillos de indias, la secuencia de cDNA y el gen del receptor Sigma-1 en humanos, la secuencia de cDNA y el gen del receptor Sigma-1 en ratones, y la secuencia de cDNA que codifica para el receptor Sigma-1 en ratas.

El primer trabajo que consiguió obtener una secuencia genética codificante para un receptor Sigma-1 se debe a Hanner y colaboradores [4]. En ese trabajo, utilizando las características específicas de unión de este receptor a determinados compuestos marcados radiactivamente, por ejemplo, (+)[<sup>3</sup>H]Pentazocina, se obtuvo primero una proteína y, posteriormente, un clon de cDNA que codificaba para la misma. El clon se aisló de una genoteca de cDNA preparada a partir de mRNAs de hígado de conejillo de indias (*C. porcellus*) [cDNA de 1857 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: Z66537]. Seguidamente, basándose en dicha secuencia de cDNA, diferentes grupos de trabajo procedieron a clonar mediante homología de secuencias, sucesivamente, el cDNA en humanos [5] (cDNA de 1653 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: HSU75283), el cDNA y

el gen de ratón [6] (cDNA de 1567 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: AF030198; gen de 6973 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: AF030199), el cDNA de rata [7] (cDNA de 1582 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: AF004218) y el gen en humanos [8] (gen descrito en tres fragmentos de DNA que contienen, respectivamente, el promotor (3589 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: AF001975), el exon 1, 2 y 3 (757 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: AF001976) y el exon 4 (1630 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: AF001977)).

El análisis de la homología existente entre dichas secuencias, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, ha puesto de manifiesto el elevado grado de homología existente entre ellas. El conocimiento de dichas secuencias puede ser utilizado en el desarrollo de modelos animales destinados a estudiar la fisiología y patología asociada con alteraciones en receptores Sigma y el efecto de fármacos potencialmente útiles para el tratamiento o prevención de patologías asociadas con alteraciones en dichos receptores o en las que están implicadas dichos receptores.

### Receptor Sigma de tipo 2

El receptor Sigma de tipo 2, en adelante receptor Sigma-2, es un receptor que se expresa en multitud de tejidos adultos de mamíferos (sistema nervioso, inmune, endocrino, hígado, riñón, etc.). Los receptores Sigma-2 pueden ser los componentes de una nueva ruta de apoptosis que podría jugar un importante papel en la regulación de la proliferación celular o en el desarrollo celular. Esta ruta parece estar constituida por receptores Sigma-2 unidos a membranas intracelulares, localizadas en orgánulos que almacenan calcio, por ejemplo, retículo endoplásmico y mitocondrias, que poseen, además, la capacidad de liberar calcio a partir de dichos orgánulos. Las señales de calcio pueden ser utilizadas en la ruta de señalización de las células normales y/o en la inducción de apoptosis.

Los agonistas de los receptores Sigma-2 inducen cambios en la morfología celular, apoptosis en diversos tipos de líneas celulares y regulan la expresión de mRNA de la p-glicoproteína, por lo que son potencialmente útiles como agentes

antineoplásicos en el tratamiento del cáncer. De hecho, se ha observado que agonistas de receptores Sigma-2 inducen apoptosis en líneas celulares de tumores de mama resistentes a agentes antineoplásicos comunes que dañan al DNA. Además, agonistas de receptores Sigma-2 potencian los efectos citotóxicos de dichos compuestos antineoplásicos a concentraciones en las que dicho agonista no es citotóxico. Por tanto, los agonistas de los receptores Sigma-2 pueden ser utilizados como agentes antineoplásicos a dosis que inducen apoptosis o bien a dosis sub-tóxicas, en combinación con otros antineoplásicos, para revertir la resistencia al fármaco permitiendo de este modo el empleo de dosis más bajas del agente antineoplásico y reduciendo consecuentemente sus efectos adversos. Los agonistas de los receptores Sigma-2 pueden utilizarse, además, en el diagnóstico por imagen del cáncer como agentes para la visualización no invasiva de tumores y sus metástasis utilizando técnicas de diagnóstico por imagen, por ejemplo, SPECT o PET. Por tanto, los receptores Sigma-2 constituyen unas dianas muy interesantes para herramientas con las que combatir el cáncer.

Los antagonistas de los receptores Sigma-2 pueden prevenir los efectos secundarios motores irreversibles causados por los agentes neurolépticos típicos. De hecho, se ha comprobado que antagonistas de los receptores Sigma-2 pueden ser útiles como agentes para mejorar los efectos debilitantes de la disquinesia tardía que aparece en los pacientes como consecuencia del tratamiento crónico de la psicosis con fármacos antipsicóticos típicos, por ejemplo, haloperidol. Los receptores Sigma-2 también parecen estar implicados en ciertos desórdenes degenerativos en donde el bloqueo de dichos receptores podría ser útil. Para más información sobre los receptores Sigma-2 véase el artículo de W.D. Bowen [3].

---

Los receptores Sigma-2 parecen estar implicados en numerosas funciones fisiológicas; no obstante, al igual que ocurre con los receptores Sigma-1, el papel real que desempeñan los receptores Sigma-2 no es totalmente conocido, por lo que existe la necesidad de profundizar en el conocimiento de los mismos. Una alternativa para contribuir al conocimiento de las funciones fisiológicas en las que están implicados dichos receptores Sigma-2 consiste en el desarrollo de modelos animales destinados a estudiar la fisiología y patología en la que pueden estar

implicados dichos receptores y el efecto de fármacos potencialmente útiles para el tratamiento y prevención de patologías en las que están implicados dichos receptores.

#### Tecnología "knockout"

La manipulación genética de mamíferos permite obtener animales transgénicos que expresen un determinado gen o que, por el contrario, tengan un gen inactivado mediante una mutación específica (animales "knockout" o mutantes). En ambos casos es evidente el potencial que representa para el diseño de modelos experimentales en animales de laboratorio que sirvan para analizar la función, *in vivo*, de un determinado gen.

La tecnología "knockout" para la generación de animales mutantes está bien establecida y ha sido objeto de numerosas publicaciones. A modo ilustrativo, pueden citarse las patentes norteamericanas US 5.464.764, US 5.487.992, US 5.627.059, US 5.631.153, US 6.194.633, US 6.207.876, US 6.239.326, US 6.245.963, US 6.245.965 y US 6.252.132, entre otras.

La no expresión de un gen puede conferir un nuevo fenotipo a un animal mutante. Dependiendo del gen no expresado por dicho animal, éste puede hacerse más o menos susceptible a una alteración patológica determinada. Tales animales mutantes son modelos valiosos para el estudio *in vivo* del papel que desempeña el gen así como para el estudio de compuestos que potencialmente podrían ser útiles en el tratamiento o prevención de patologías relacionadas con la expresión nula o ineficaz del producto de dicho gen.

Aunque se ha descrito que los receptores Sigma muestran afinidad por ~~compuestos con distintas actividades farmacológicas actualmente se desconoce el~~ papel real que desempeñan dichos receptores, por lo que existe la necesidad de generar modelos animales para estudiar *in vivo* el papel desempeñado por los receptores Sigma endógenos. Un animal mutante, deficiente en receptores Sigma endógenos, ayudaría a definir el papel que desempeñan *in vivo* dichos receptores y permitiría el diseño y evaluación de compuestos potencialmente interesantes para el tratamiento de procesos relacionados con la expresión nula o ineficaz de dichos

receptores Sigma. La invención proporciona una solución a dicha necesidad existente.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con un mamífero no humano mutante que tiene células somáticas y germinales en las que, al menos un alelo y, preferentemente, ambos alelos, de un gen de un receptor Sigma endógeno contienen un DNA exógeno que ha sido insertado en dicho gen de manera que dicho mamífero no humano mutante no expresa el producto del gen del receptor Sigma endógeno. Dicho receptor Sigma puede ser cualquier receptor Sigma, por ejemplo, el receptor Sigma-1 o el receptor Sigma-2. En una realización particular, el DNA exógeno insertado en el alelo del gen Sigma endógeno comprende un marcador de selección positiva.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un mamífero no humano, viable, cuyo genoma posee el gen de un receptor Sigma endógeno mutado y carece de niveles detectables de RNA mensajero o proteínas para dicho receptor Sigma endógeno. En una realización particular, dicho mamífero no humano mutante es un animal no humano perteneciente a la clase de los mamíferos, por ejemplo, un ratón mutante, deficiente en el receptor Sigma-1 endógeno. Los ratones deficientes en el receptor Sigma-1 son viables, fértiles y no manifiestan, en condiciones de laboratorio, ningún síntoma que los diferencie de ratones genéticamente similares pero carentes de dicha mutación. En condiciones de estabulación controlada los ratones mutantes en el receptor Sigma-1 son indistinguibles de sus hermanos de camada salvajes. La función (o disfunción) del receptor Sigma-1 se ha postulado ~~que puede estar asociada a desórdenes del sistema nervioso central, tales como la~~ ansiedad, depresión, esquizofrenia o psicosis. El receptor Sigma-1 parece tener actividad anti-amnésica y neuroprotectora y se le ha relacionado, además, con la percepción y transducción de la analgesia, adicción o estrés. Para estas situaciones, que en humanos pueden derivar en condiciones patológicas, el ratón deficiente en el receptor Sigma-1 podría resultar útil tanto para el estudio de las mismas como para la validación y/o el desarrollo de fármacos diseñados para regular o paliar los

efectos de las alteraciones y condiciones patológicas en las que están implicados dichos receptores Sigma-1.

En otra realización particular, dicho mamífero no humano mutante es un animal no humano perteneciente a la clase de los mamíferos, por ejemplo, un ratón mutante, deficiente en el receptor Sigma-2 endógeno. Los receptores Sigma-2 parecen ser dianas muy interesantes para el diseño de herramientas, tanto diagnósticas como terapéuticas, para combatir el cáncer y/o compuestos capaces de prevenir, reducir o aliviar los efectos secundarios motores provocados en pacientes sometidos a tratamiento continuado con agentes neurolépticos. Por tanto, los ratones deficientes en receptores Sigma-2 podrían resultar útiles en la validación y/o desarrollo de fármacos diseñados para el diagnóstico o tratamiento del cáncer, en la validación y/o desarrollo de fármacos diseñados para la prevención y/o tratamiento de procesos degenerativos, así como en la validación y/o desarrollo de fármacos para prevenir, reducir o aliviar los efectos secundarios asociados con la administración continuada de agentes neurolépticos a un paciente, en particular, los efectos secundarios motores.

La mutación en el gen del receptor Sigma endógeno presente en el genoma de una célula puede ser introducida por recombinación homóloga en dicha célula entre un alelo del gen del receptor Sigma endógeno y un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa que comprende unas regiones de homología con sendas secuencias de nucleótidos presentes en dicho gen del receptor Sigma endógeno, y selección de los homólogos recombinantes mediante la técnica de selección positiva-negativa, los cuales se introducen en embriones que posteriormente son implantados en hembras receptoras para su adecuada gestación y se deja que se desarrollen a término. Las quimeras capaces de transmitir eficazmente el genotipo de los homólogos recombinantes a su descendencia a través de la línea germinal se cruzan con mamíferos no humanos tipo salvaje para obtener mutantes heterocigotos para la disrupción del gen del receptor Sigma endógeno y, posteriormente, los mutantes heterocigotos se cruzan entre sí para obtener mutantes homocigotos, siguiendo una clásica segregación alélica de tipo mendeliano.



En una realización particular, dicho mamífero no humano mutante, deficiente en un receptor Sigma endógeno, es un mutante heterocigoto para dicha mutación, mientras que en otra realización particular, dicho mamífero no humano mutante, es un mutante homocigoto para dicha mutación.

La descendencia del mamífero no humano mutante deficiente en un receptor Sigma endógeno constituye un aspecto adicional de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con células aisladas a partir de dicho mamífero no humano mutante deficiente en un receptor Sigma endógeno, las cuales pueden ser propagadas y, opcionalmente, inmortalizadas. Dichas células pueden ser heterocigotas, es decir, que contienen un alelo mutante y un alelo tipo salvaje del gen del receptor Sigma endógeno o bien homocigotas, es decir, que contienen los dos alelos mutantes del gen del receptor Sigma endógeno.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa, útil para introducir una disrupción funcional en un gen de un receptor Sigma, que comprende: a) una primera región de homología, situada en el extremo 5' de una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva, en donde dicha primera región de homología tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una primera secuencia de un gen de un receptor Sigma; b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva; c) una segunda región de homología, situada en el extremo 3' de dicha secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva, en donde dicha segunda región de homología tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una segunda secuencia de dicho gen del receptor Sigma, estando dicha segunda secuencia del gen del receptor Sigma en una posición 3' respecto a dicha primera secuencia del gen del receptor Sigma en un gen Sigma endógeno tipo salvaje; y d) una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección negativa.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora en la que dicho vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa ha sido introducido por recombinación homóloga entre dicho vector y el correspondiente gen del receptor Sigma endógeno de dicha célula hospedadora,

dando como resultado una disrupción funcional en dicho gen del receptor Sigma endógeno. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula diferenciada que normalmente expresa el producto del gen de un receptor Sigma o una célula pluripotente indiferenciada e inmortal, tal como una célula embrional ES (*embryonic stem cell*), establecida a partir de la masa interna celular del embrión en la fase preimplantatoria denominada blastocisto. En una realización concreta, dichas células embrionales ES son células de ratón.

El mamífero no humano mutante de la invención puede ser utilizado como modelo animal para estudiar *in vivo* el papel desempeñado por los receptores Sigma endógenos así como en el diseño y evaluación de compuestos químicos que podrían ser potencialmente interesantes para el tratamiento de alteraciones patológicas relacionadas con la expresión nula o ineficaz de los productos de dichos genes, o en las que estuvieran involucrados tales genes. Asimismo, dicho mamífero no humano mutante de la invención podría ser utilizado como fuente de células para cultivos celulares.

Aspectos adicionales de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la materia a la vista de la descripción y reivindicaciones.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra esquemáticamente los primeros clones de cDNA (Figura 1A) y genómicos (Figura 1B) obtenidos a partir de métodos de RT-PCR o PCR, respectivamente. En la Figura 1A se representa el plásmido **pmcS1/N**, que corresponde al fragmento cDNA de 1020 pares de bases, obtenido a partir de los oligonucleótidos MS2/MS4 [véase la Tabla I].

---

La Figura 2 muestra el mapa de las secuencias colindantes al gen del receptor Sigma-1 de ratón obtenido a partir del solapamiento de los mapas correspondientes a los cuatro clones de bacteriófagos ( $\lambda$ Sg1,  $\lambda$ Sg2,  $\lambda$ Sg5,  $\lambda$ Sg6) aislados con secuencias 5' y 3', circundantes a la secuencia publicada del gen. Las abreviaturas de los enzimas de restricción se describen en la Figura 3. Las cajas negras corresponden a los cuatro exones del gen del receptor Sigma-1 de ratón.

La Figura 3 muestra esquemáticamente los diferentes plásmidos originales

obtenidos con insertos de DNA genómico correspondientes a secuencias situadas en la región 5' y 3' del gen del receptor Sigma-1 de ratón, identificados para su posterior utilización en la construcción del vector de recombinación homóloga. Se incluyen las abreviaturas de los enzimas de restricción. Las cajas negras corresponden a los cuatro exones del gen del receptor Sigma-1 de ratón.

La Figura 4 muestra esquemáticamente la secuencia del gen del receptor Sigma-1 de ratón a eliminar utilizando procedimientos de recombinación homóloga en células ES de ratón, usando la secuencia AF030199 como referencia. Las cajas negras representan las zonas codificantes mientras que las cajas a rayas representan las secuencias 5' y 3' transcritas pero no traducidas.

La Figura 5 muestra esquemáticamente las secuencias de homología 5' y 3', de 6,8 y 3,1 kb de tamaño respectivamente, seleccionadas para su inclusión en el vector de recombinación homóloga pHR53TK con objeto de inactivar el gen del receptor Sigma-1 de ratón. Las abreviaturas de los enzimas de restricción se describen en la Figura 3.

La Figura 6 ilustra la verificación de la secuencia de DNA en la fusión transcripcional entre la región 5' de homología del gen del receptor Sigma-1 de ratón y los primeros nucleótidos del gen indicador *lacZ*, presente en el vector pHM2.

La Figura 7 muestra el mapa del vector de recombinación homóloga para la inactivación del gen del receptor Sigma-1 de ratón en células embrionales ES. Se indica el sitio de restricción único *Sal I*, que identifica el punto de linearización del vector para su transfección en células ES.

La Figura 8 ilustra el diseño experimental utilizado para distinguir el alelo mutante del alelo salvaje del gen del receptor Sigma-1 de ratón en análisis mediante polimorfismos asociados a la digestión por enzimas de restricción en análisis por Southern blot.

La Figura 9 muestra el resultado de los análisis mediante *Southern blot* del DNA genómico correspondiente a los 12 clones positivos de células ES recombinantes en donde se muestran los polimorfismos esperados, tanto con la sonda 5' como con la sonda 3'. Los carriles C y M representan DNA de células ES control y un marcador de peso molecular.

La Figura 10 muestra el esquema de los tests analíticos mediante PCR usado para establecer el genotipo de los ratones portadores de alelos mutantes y salvajes del gen del receptor Sigma-1.

La Figura 11 muestra los resultados de los análisis mediante *Southern blot* de ratones homocigotos salvajes (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos mutantes (-/-) mediante digestión de DNA genómico con los enzimas *Hind* III y *Eco*R I e hibridación consecutiva con las sondas 5' y 3', respectivamente. Los tamaños de los fragmentos de DNA corresponden a los esperados según el diseño experimental (Figura 8).

La Figura 12 muestra los resultados de los análisis mediante *Northern blot* de la expresión del gen del receptor Sigma-1 (mSR1) en RNA total de hígado, riñón, cerebro y corazón aislado de ratones homocigotos salvajes (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos mutantes (-/-). Se incluye, en la zona inferior, la fotografía de los RNA ribosomales utilizada como control de carga.

La Figura 13 muestra los resultados de los análisis mediante *Western blot* de ratones homocigotos salvajes (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos mutantes (-/-) ilustrativos de la expresión del gen del receptor Sigma-1 en cerebro de ratón usando un anticuerpo policlonal específico frente al receptor Sigma-1 de ratón.

La Figura 14 ilustra la actividad (función) del receptor Sigma-1 de ratón mediante un ensayo de unión específica al ligando [<sup>3</sup>H]-pentazocina. La Figura 14A es una gráfica en la que se representa la unión específica (ordenadas) de dicho ligando a receptores Sigma-1 de ratones homocigotos salvajes, heterocigotos y homocigotos mutantes en función de la concentración de ligando (abscisas). La Figura 14B es una gráfica que representa la relación "ligando unido/ligando libre" (B/F) (ordenadas) frente a la concentración de ligando unido (abscisas) en función del origen de dichos receptores Sigma-1 (ratones homocigotos salvajes, heterocigotos y homocigotos mutantes).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona un mamífero no humano mutante, deficiente en un receptor Sigma endógeno, en adelante mamífero no humano mutante de la invención, cuyo genoma contiene una mutación que comprende una

disrupción en un gen de un receptor Sigma endógeno.

El término "mamífero no humano", tal como se utiliza en esta descripción, incluye a cualquier animal no humano perteneciente a la clase de los mamíferos, por ejemplo, ratones. El término "mamífero no humano mutante de la invención", tal como aquí se utiliza, se refiere a un mamífero no humano que ha sido manipulado para que sea deficiente en un receptor Sigma endógeno, es decir, que tiene una mutación que impide la expresión normal del producto del gen de un receptor Sigma y, por tanto, carece de niveles detectables de RNA mensajero o proteína para el receptor Sigma endógeno. Dicha expresión "mamífero no humano mutante de la invención" incluye tanto mutantes heterocigotos (es decir, que contienen un alelo mutante y un alelo tipo salvaje del gen del receptor Sigma endógeno) como homocigotos. En una realización particular y preferida de esta invención, el mamífero no humano mutante de la invención es un mutante homocigoto, es decir, contiene los dos alelos mutantes del gen del receptor Sigma endógeno dando como resultado una expresión no detectable del producto génico.

El término "receptor Sigma", tal como aquí se utiliza, se refiere al receptor Sigma de tipo 1 (Sigma-1) y al receptor Sigma de tipo 2 (Sigma-2).

La mutación presente en el genoma del mamífero no humano de la invención puede estar presente tanto en las células somáticas como en las células germinales del mamífero no humano mutante de la invención. Ventajosamente, dicha mutación está presente en las células germinales del mamífero no humano mutante de la invención, confiriéndole de ese modo la capacidad de transferir dicha mutación a su descendencia. Por tanto, en una realización particular de esta invención, el mamífero no humano mutante de la invención es fértil y puede transmitir la mutación que posee a su descendencia.

La mutación presente en el mamífero no humano mutante de la invención comprende una inserción, una delección o una mutación puntual que causa una disrupción funcional en un gen de un receptor Sigma endógeno, dando lugar a un mamífero no humano mutante deficiente en dicho receptor Sigma endógeno. En una realización particular, el genoma del mamífero no humano mutante de la invención comprende un transgén dentro de la mutación introducida en el gen del receptor

Sigma endógeno. A modo ilustrativo, dicho transgén comprende un gen que codifica para un marcador de selección positiva, por ejemplo, el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*) que codifica para la resistencia a neomicina o cualquier otro de los marcadores de selección positiva mencionados más adelante en relación con el vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa proporcionado por esta invención.

En una realización concreta de esta invención, se proporciona un ratón mutante, deficiente en el receptor Sigma-1 endógeno, homocigoto para el gen del receptor Sigma-1 endógeno, fértil, cuyo genoma contiene una disrupción en dicho gen que comprende el gen *neo*.

El mamífero no humano mutante de la invención puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende la introducción de una disrupción funcional en un gen de un receptor Sigma endógeno presente en el genoma de una célula. En una realización particular, dicha disrupción funcional se introduce mediante recombinación homóloga en un gen de un receptor Sigma endógeno, por ejemplo, en el gen del receptor Sigma-1 o en el gen del receptor Sigma-2, presente en el genoma de una célula apropiada, tal como, por ejemplo, una célula diferenciada que normalmente expresa dicho gen del receptor Sigma, o una célula embrional ES pluripotente, mediante la introducción de un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa en dicha célula, y selección de los homólogos recombinantes mediante la técnica de selección positiva-negativa, los cuales pueden utilizarse para la generación de los mamíferos no humanos mutantes de la invención tal como se describe más adelante. Alternativamente, el mamífero no humano mutante de la invención puede obtenerse mediante técnicas de cruzamiento clásico, o fertilización *in vitro*, entre mamíferos no humanos mutantes de la invención que actúen como progenitores.

En otro aspecto, la invención proporciona clones recombinantes de células embrionales ES pluripotentes heterocigotas, es decir, que poseen uno de los alelos génicos de un receptor Sigma mutado. A partir de dichas células se pueden obtener quimeras y, a partir de éstas, mamíferos no humanos mutantes deficientes en un receptor Sigma. En una realización particular, dichas células embrionales ES

Sigma endógeno. A modo ilustrativo, dicho transgén comprende un gen que codifica para un marcador de selección positiva, por ejemplo, el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*) que codifica para la resistencia a neomicina o cualquier otro de los marcadores de selección positiva mencionados más adelante en relación con el vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa proporcionado por esta invención.

En una realización concreta de esta invención, se proporciona un ratón mutante, deficiente en el receptor Sigma-1 endógeno, homocigoto para el gen del receptor Sigma-1 endógeno, fértil, cuyo genoma contiene una disrupción en dicho gen que comprende el gen *neo*.

El mamífero no humano mutante de la invención puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende la introducción de una disrupción funcional en un gen de un receptor Sigma endógeno presente en el genoma de una célula. En una realización particular, dicha disrupción funcional se introduce mediante recombinación homóloga en un gen de un receptor Sigma endógeno, por ejemplo, en el gen del receptor Sigma-1 o en el gen del receptor Sigma-2, presente en el genoma de una célula apropiada, tal como, por ejemplo, una célula diferenciada que normalmente expresa dicho gen del receptor Sigma, o una célula embrional ES pluripotente, mediante la introducción de un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa en dicha célula, y selección de los homólogos recombinantes mediante la técnica de selección positiva-negativa, los cuales pueden utilizarse para la generación de los mamíferos no humanos mutantes de la invención tal como se describe más adelante. Alternativamente, el mamífero no humano mutante de la invención puede obtenerse mediante técnicas de cruzamiento clásico, o fertilización *in vitro*, entre mamíferos no humanos mutantes de la invención que actúen como progenitores.

En otro aspecto, la invención proporciona clones recombinantes de células embrionales ES pluripotentes heterocigotas, es decir, que poseen uno de los alelos génicos de un receptor Sigma mutado. A partir de dichas células se pueden obtener quimeras y, a partir de éstas, mamíferos no humanos mutantes deficientes en un receptor Sigma. En una realización particular, dichas células embrionales ES

pluripotentes heterocigotas son células de ratón a partir de las cuales se pueden obtener quimeras y, a partir de éstas, ratones mutantes deficientes en un receptor Sigma.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa, en adelante vector de la invención, que comprende:

- a) una primera región de homología, situada en el extremo 5' de una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva, en donde dicha primera región de homología tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una primera secuencia de un gen de un receptor Sigma;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva;
- c) una segunda región de homología, situada en el extremo 3' de dicha secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva, en donde dicha segunda región de homología tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una segunda secuencia de dicho gen del receptor Sigma, estando dicha segunda secuencia del gen del receptor Sigma en una posición 3' respecto a dicha primera secuencia del gen del receptor Sigma en un gen Sigma endógeno tipo salvaje; y
- d) una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección negativa.

El receptor Sigma puede ser cualquier receptor Sigma, por ejemplo, un receptor Sigma-1 o un receptor Sigma-2.

El vector de la invención puede ser utilizado para introducir una interrupción funcional en un gen de un receptor Sigma endógeno, por ejemplo, en el gen del receptor Sigma-1 o en el gen del receptor Sigma-2, contenido en el genoma de una célula mediante la técnica de recombinación homóloga y selección positiva-negativa de los recombinantes homólogos, los cuales pueden ser utilizados en la obtención de mamíferos no humanos mutantes deficientes en un receptor Sigma endógeno.



La secuencia de nucleótidos que codifica para el marcador de selección positiva está flanqueada en sus posiciones 5' y 3' por unas secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas a unas secuencias de dicho gen del receptor Sigma que corresponden a dichas primera y segunda regiones de homología, respectivamente. Tal como se utiliza en esta descripción, una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente idéntica" a una secuencia de un gen de un receptor Sigma cuando dicha secuencia de nucleótidos tiene la suficiente homología con la secuencia de dicho gen del receptor Sigma como para permitir la recombinación homóloga entre dicha secuencia de nucleótidos y una secuencia del gen Sigma endógeno en una célula hospedadora. Típicamente, las secuencias de nucleótidos de dichas primera y segunda regiones de homología son, al menos, un 90%, preferentemente, al menos, un 95% y aun más preferentemente, un 100% idénticas a las secuencias de nucleótidos del gen del receptor Sigma endógeno a las que van dirigidas para la recombinación homóloga. Ventajosamente, dichas primera y segunda regiones de homología son isogénicas con respecto al alelo endógeno al que van dirigidas (es decir, el DNA de dichas regiones de homología se aísla a partir de células del mismo fondo genético que el de la célula en el que se va a introducir el vector de la invención). Dichas regiones de homología deben tener una longitud suficiente como para que tenga lugar la recombinación homóloga entre el vector de la invención y el gen del receptor Sigma endógeno en una célula hospedadora cuando el vector de la invención se introduce en dicha célula. Típicamente, la longitud total de dichas regiones de homología es de, al menos, 5 kilobases (kb), preferentemente de, al menos, 10 kb.

En una realización particular, dichas primera y segunda regiones de homología ~~se eligen de manera que sus secuencias de nucleótidos sean~~ sustancialmente idénticas a sendas secuencias de nucleótidos del gen del receptor Sigma endógeno que flanqueen una región de dicho gen destinada a ser eliminada mediante recombinación homóloga y reemplazada por la secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva.

Dichas primera y segunda regiones de homología se elegirán en función de la secuencia del gen del receptor Sigma endógeno en el que se desea introducir una

disrupción que da lugar a la ausencia de niveles detectables de receptor Sigma endógeno en el homólogo recombinante y, consecuentemente, en función del animal mutante, deficiente en el receptor Sigma endógeno, que se desea obtener. Se han descrito la secuencia de cDNA que codifica para el receptor Sigma-1 en conejillos de indias, la secuencia de cDNA y el gen del receptor Sigma-1 en humanos, la secuencia de cDNA y el gen del receptor Sigma-1 en ratones, y la secuencia de cDNA que codifica para el receptor Sigma-1 en ratas [4]-[8]. Clones genómicos o de cDNA codificantes de receptores Sigma-1 endógenos de animales para los que todavía no se conoce su secuencia de nucleótidos pueden obtenerse por métodos convencionales a partir de genotecas de células de dichas especies a la vista de las secuencias de los genes de receptores Sigma-1 conocidas debido a la elevada homología observada entre las mismas. Asimismo, información sobre la secuencia de DNA genómico o de cDNA del gen del receptor Sigma-2 puede obtenerse a partir de publicaciones o bases de datos de secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas, o bien se pueden obtener clones genómicos o de cDNA codificantes de receptores Sigma-2 endógenos mediante el empleo de métodos convencionales, con las debidas modificaciones, a partir de genotecas de células que los expresan mediante una estrategia similar a la descrita en los Ejemplos 1 y 2 de esta descripción o bien mediante aproximaciones similares, con las debidas modificaciones, a las seguidas por otros autores para la obtención de la secuencia codificante del gen del receptor Sigma-1 [4].

Dichas primera y segunda regiones de homología pueden obtenerse por métodos convencionales a la vista de la secuencia de nucleótidos del gen del receptor Sigma en el que se desea introducir una disrupción, por ejemplo, mediante ~~el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o RT/PCR [transcripción~~ inversa/reacción en cadena de la polimerasa] utilizando los oligonucleótidos iniciadores apropiados. En el Ejemplo 1.1 se describe el aislamiento del gen del receptor Sigma-1 de ratón.

En una realización particular, el vector de la invención comprende una primera región de homología cuya secuencia de nucleótidos es sustancialmente idéntica a una primera secuencia de nucleótidos de 6,8 kb del gen del receptor

Sigma-1 de ratón y una segunda región de homología cuya secuencia de nucleótidos es sustancialmente idéntica a una segunda secuencia de nucleótidos de 3,1 kb de dicho gen del receptor Sigma-1 de ratón, que delimitan una secuencia de 1,9 kb de dicho gen [véase la Figura 5] que se elimina mediante recombinación homóloga con el vector de la invención.

La secuencia de nucleótidos que codifica para el marcador de selección positiva confiere una característica de selección positiva en las células que lo contienen, es decir, permite seleccionar las células que contienen y expresan dicho marcador de selección positiva frente a las células que no lo contienen. La secuencia de nucleótidos que codifica para el marcador de selección positiva puede estar operativamente unida a unos elementos reguladores que controlan de forma independiente la expresión de dicho marcador, constituyendo un cassette de expresión de selección positiva, o bien el vector de la invención puede construirse de manera que la expresión de dicho marcador tenga lugar bajo el control de los elementos reguladores del gen del receptor Sigma endógeno. Prácticamente cualquier marcador de selección positiva puede ser utilizado en la construcción del vector de la invención. Ejemplos ilustrativos de marcadores de selección positiva pueden encontrarse, por ejemplo, en la descripción de la patente norteamericana US 5.464.764. En una realización particular, el vector de la invención contiene una secuencia de nucleótidos que comprende el gen neo que confiere resistencia a la mortalidad celular asociada al tratamiento con el antibiótico frente a la neomicina o alguno de sus análogos, tales como el sulfato de G418.

La secuencia de nucleótidos que codifica para el marcador de selección negativa está situada en una posición distal, 5' ó 3', respecto a dichas primera y segunda regiones de homología, y está operativamente unida a los elementos reguladores que controlan la expresión de dicho marcador de selección negativa constituyendo un cassette de expresión de selección negativa. Ventajosamente, dicha secuencia de nucleótidos que codifica para el marcador negativo es sustancialmente "no idéntica" a ninguna secuencia del gen del receptor Sigma, es decir, la secuencia de nucleótidos que codifica para el marcador de selección negativa no tiene la suficiente homología con ninguna secuencia del gen del

receptor Sigma como para permitir la recombinación homóloga entre dichas secuencias, es decir, el grado de identidad entre los nucleótidos de dicha secuencia de nucleótidos que codifica para el marcador de selección negativa y la secuencia del gen del receptor Sigma debe ser inferior al 45%, preferentemente inferior al 30% con el fin de evitar recombinaciones indeseadas. Además, esta secuencia de nucleótidos, ventajosamente, no es idéntica a ninguna otra secuencia del genoma del mamífero no humano. El marcador de selección negativa confiere una característica de selección negativa en las células que lo contienen, es decir, permite seleccionar las células que no contienen dicho marcador de selección negativa frente a las células que lo contienen y expresan ya que estas últimas morirán por acción del agente de selección negativa mientras que las que no lo contienen sobrevivirán. Aunque prácticamente cualquier marcador de selección negativa puede ser utilizado en la construcción del vector de la invención, preferentemente se elegirán aquellos que cumplan la condición de que la secuencia de nucleótidos que codifica para dicho marcador de selección negativa no sea sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos del gen del receptor Sigma endógeno ni a ninguna otra secuencia del genoma del mamífero no humano. Ejemplos ilustrativos de marcadores de selección negativa pueden encontrarse, por ejemplo, en la patente norteamericana US 5.464.764. En una realización particular de esta invención, el vector de la invención contiene una secuencia de nucleótidos que comprende el gen de la timidina quinasa (*tk*) del virus del herpes simplex (HSV). La síntesis de DNA puede interrumpirse en las células que contienen y expresan dicho gen *tk*. Estas células pueden eliminarse utilizando como agente de selección negativa el ganciclovir o cualquier otro análogo nucleotídico funcionalmente equivalente.

---

En una realización particular, el vector de la invención es un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa que comprende unas primera y segunda regiones de homología sustancialmente idénticas a unas primera y segunda secuencias, respectivamente, del gen Sigma-1 de ratón, una secuencia de nucleótidos que comprende el gen *neo* y una secuencia de nucleótidos que comprende el gen *tk*, tal como el vector denominado pHR53TK [véase la Figura 7],

que puede ser utilizado para transformar células de ratón, por ejemplo, células embrionales ES de ratón, que contienen el gen del receptor Sigma-1 endógeno, mediante recombinación homóloga y obtener células de ratón, en primer lugar con uno de los alelos mutados del gen del receptor Sigma-1 endógeno, y, en segundo lugar, mediante un segundo evento de recombinación homóloga en el alelo salvaje restante del genoma, que carecen de niveles detectables de RNA mensajero o proteína para el receptor Sigma-1 endógeno. En el Ejemplo 1.2 se describe de forma detallada la construcción del vector pHR53TK.

Para la construcción del vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa proporcionado por esta invención se pueden utilizar métodos convencionales de digestión con enzimas de restricción y unión, y similares, tales como los descritos por Sambrook et al. [17].

El vector de la invención permite el empleo de la técnica de selección "positiva-negativa" para seleccionar los recombinantes homólogos, es decir, permite seleccionar las células en las que se ha introducido dicho vector ya que éstas contienen y expresan el marcador de selección positiva pero han perdido el marcador de selección negativa como resultado de la recombinación homóloga entre el vector y el gen del receptor Sigma endógeno.

El vector de la invención puede ser utilizado para introducir una disrupción funcional en el gen de un receptor Sigma endógeno, por ejemplo, en el gen del receptor Sigma-1 o en el gen del receptor Sigma-2, presente en el genoma de una célula de mamífero no humano, y crear homólogos recombinantes (células hospedadoras recombinantes) que, a su vez, pueden ser utilizados para generar mamíferos no humanos mutantes, deficientes en un receptor Sigma endógeno. Para ello, el vector de la invención se introduce en dicha célula por cualquier método convencional adecuado para la introducción de un DNA exógeno en una célula, por ejemplo, precipitación con fosfato cálcico, transfección, microinyección, lipofección, etc., preferentemente mediante electroporación. Tras la introducción del vector de la invención en la célula hospedadora, ésta se cultiva durante un periodo de tiempo apropiado bajo condiciones que permitan la recombinación homóloga entre el vector de la invención y el gen del receptor Sigma endógeno. Los recombinantes

homólogos se seleccionan mediante el proceso de selección positiva-negativa y se analiza la existencia de recombinación homóloga en el locus del gen del receptor Sigma endógeno por técnicas convencionales, por ejemplo, mediante un análisis *Southern blot* utilizando una sonda que permite diferenciar entre el alelo endógeno normal (tipo salvaje) y el alelo del recombinante homólogo. En el Ejemplo 2.1 se describe la inactivación del gen del receptor Sigma-1 de ratón mediante recombinación homóloga en células embrionales ES de ratón y la obtención de ratones quiméricos (quimeras) con una mutación en el gen del receptor Sigma-1 de ratón mediante la técnica de agregación de mórulas, evaluándose la transmisión por línea germinal de dicha mutación mediante cruces de las quimeras respectivas con hembras de una cepa receptora, tal como una hembra de la cepa no consanguínea CD-1, cuyo pelaje albino es netamente distinguible del pelaje pigmentado característico de los ratones híbridos F<sub>1</sub> generados a partir de cruces entre las cepas 129X1/SvJ y 129S1/Sv del cual derivan las células ES R1 utilizadas en el proceso de recombinación homóloga.

Los recombinantes homólogos (células hospedadoras recombinantes), que contienen un alelo del gen del receptor Sigma mutado, pueden utilizarse para generar los mamíferos no humanos mutantes de la invención. Para ello, dichas células hospedadoras recombinantes que contienen una disrupción en el gen del receptor Sigma endógeno se introducen en embriones por métodos convencionales, por ejemplo, mediante agregación de las células recombinantes con embriones en fase de 8 células (mórulas), los cuales son posteriormente implantados en mamíferos hembras receptoras pseudogestantes y se deja que los embriones se desarrollen a término. Los animales resultantes son unas quimeras sobre las que se analiza la transmisibilidad de la mutación por vía germinal. Las quimeras capaces de transmitir eficazmente el genotipo de las células hospedadoras a su descendencia a través de la línea germinal se cruzan con mamíferos no humanos tipo salvaje para obtener mutantes heterocigotos para la disrupción del gen Sigma endógeno en células somáticas y germinales. Posteriormente, los mutantes heterocigotos se cruzan entre sí para obtener mutantes homocigotos. El Ejemplo 2.2 describe la obtención de ratones mutantes (heterocigotos y homocigotos) para el gen del

receptor Sigma-1 endógeno verificándose que eran deficientes en dicho gen tal como se describe en el Ejemplo 2.3 mediante los correspondientes análisis estructurales, de expresión y función, en los ratones mutantes homocigotos.

La descendencia de un mamífero no humano mutante de la invención, que constituye un aspecto adicional de esta invención, puede obtenerse mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas de cruzamiento clásico entre mamíferos no humanos mutantes de la invención (progenitores) o bien, alternativamente, mediante fertilización *in vitro* de huevos y/o espermatozoides de los mamíferos no humanos mutantes de la invención o mediante clonación, por transferencia nuclear y reconstrucción posterior de óvulos enucleados con núcleos de células mutantes o portadoras de la mutación de tipo embrional o somático. Tal como se utiliza en esta descripción, el término "descendencia" y "descendencia de un mamífero no humano mutante de la invención" se refiere a todos y cada uno de los descendientes de cada generación posterior a la de los mamíferos no humanos originalmente transformados.

Los mamíferos no humanos mutantes de la invención pueden ser utilizados como animales control para la realización de ensayos *in vivo* (véase más adelante). Asimismo, los mamíferos no humanos mutantes de la invención pueden ser utilizados como fuente de células somáticas, fetales o embrionales, las cuales, una vez aisladas y cultivadas pueden ser utilizadas en ensayos *in vitro*. Además, si se desea, se pueden preparar líneas celulares inmortalizadas a partir de dichas células mediante el empleo de técnicas convencionales [18-21]. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una línea celular aislada derivada del mamífero no humano mutante de la invención. En una realización particular, dicha línea celular proporcionada por esta invención es una línea celular murina, por ejemplo, una línea de células embrionales ES de ratón que comprende una mutación en el gen del receptor Sigma-1 de ratón en donde dicha línea celular carece de niveles detectables de receptor Sigma-1.

Los mamíferos no humanos mutantes de la invención pueden ser utilizados, además, como animales modelo para estudiar el papel desempeñado *in vivo* por los receptores Sigma endógenos, en particular, los receptores Sigma-1 o Sigma-2, y

como animales control para la realización de ensayos *in vivo*.

El receptor Sigma-1 parece estar implicado en desórdenes del sistema nervioso central, tales como la ansiedad, depresión o esquizofrenia, en alteraciones de la memoria, por ejemplo, amnesia, y en condiciones de estrés y adicción a drogas. Asimismo, dicho receptor Sigma-1 parece estar implicado en procesos de analgesia y neuroprotección. Por tanto, un mamífero no humano mutante, deficiente en el receptor Sigma-1, proporcionado por esta invención, puede resultar útil tanto para el estudio de tales situaciones así como para la validación y/o el desarrollo de fármacos diseñados para regular o paliar los efectos de las alteraciones y condiciones patológicas en las que estén implicados dichos receptores Sigma-1.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un mamífero no humano mutante de la invención, o de una línea celular proporcionada por esta invención, deficiente en el receptor Sigma-1, para evaluar compuestos potencialmente útiles destinados a

- prevenir y/o tratar desórdenes del sistema nervioso central, por ejemplo, ansiedad, esquizofrenia o depresión;
- prevenir y/o tratar alteraciones de la memoria, por ejemplo, amnesia;
- prevenir y/o tratar condiciones de estrés;
- prevenir y/o tratar condiciones de adicción a drogas;
- producir analgesia; o
- producir neuroprotección.

Los receptores Sigma-2 parecen ser dianas para el diseño de herramientas, tanto diagnósticas como terapéuticas, para combatir el cáncer y/o procesos degenerativos y/o para el diseño de compuestos capaces de prevenir, reducir o aliviar la patología secundaria asociada a la administración de agentes neurolépticos, por ejemplo, alteraciones secundarias motoras provocadas en pacientes sometidos a tratamiento continuado con agentes neurolépticos, tales como haloperidol. Por tanto, un mamífero no humano deficiente en el receptor Sigma-2 puede resultar útil en la validación y/o desarrollo de fármacos diseñados para el diagnóstico o tratamiento del cáncer, así como en la validación y/o desarrollo de fármacos para la prevención y/o el tratamiento de procesos degenerativos, o en



la validación y/o desarrollo de fármacos diseñados para prevenir, reducir o aliviar los efectos secundarios asociados con la administración continuada a un paciente de agentes neurolépticos, en particular, los efectos secundarios motores.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un mamífero no humano mutante de la invención, o de una línea celular proporcionada por esta invención, deficiente en el receptor Sigma-2, para la validación y/o desarrollo de fármacos diseñados para

el diagnóstico o tratamiento del cáncer,

la prevención y/o el tratamiento de procesos degenerativos, o para

prevenir, reducir o aliviar los efectos secundarios asociados con la administración de agentes neurolépticos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar el efecto de un compuesto a ensayar sobre un mamífero no humano deficiente en un receptor Sigma endógeno, tal como un receptor Sigma-1 o Sigma-2, que comprende poner en contacto un mamífero no humano mutante de la invención con dicho compuesto a ensayar y detectar la presencia o ausencia de un cambio fisiológico en dicho mamífero no humano mutante en respuesta al contacto con dicho compuesto; o bien, administrar un compuesto a ensayar a dicho mamífero no humano mutante de la invención, administrar dicho compuesto a ensayar a un mamífero no humano control que expresa el receptor Sigma endógeno funcional correspondiente, por ejemplo, el receptor Sigma-1 o el receptor Sigma-2, y observar si dicho compuesto produce un efecto sobre el fenotipo en dicho mamífero no humano mutante cuando se compara con el mamífero no humano control. Cualquier efecto observable sobre el fenotipo podría estar relacionado, en principio, con la función (o disfunción) del receptor Sigma considerado.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar el efecto de un compuesto sobre células que expresan un receptor Sigma, por ejemplo, el receptor Sigma-1 o el receptor Sigma-2, y sobre células que no expresan dicho receptor Sigma, que comprende introducir un compuesto a ensayar en una población de células, o en un homogeneizado de las mismas, en donde dichas células son células aisladas o establecidas a partir de un mamífero no humano

mutante de la invención, administrar dicho compuesto a ensayar a una población de células de mamífero no humano control, o a un homogeneizado de las mismas, que expresa el correspondiente receptor Sigma funcional, y observar o analizar si dicho compuesto a ensayar produce un efecto sobre la expresión de dicho receptor Sigma en las células de dicho mamífero no humano mutante de la invención cuando se compara con células de mamífero no humano control. En principio, cualquier efecto observable sobre el fenotipo podría estar relacionado con la función (o disfunción) del receptor Sigma considerado.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma. La combinación de los Ejemplos 1 y 2 describe de forma detallada un procedimiento para la generación de ratones mutantes en el gen del receptor Sigma-1 endógeno que carecen de niveles detectables del receptor Sigma-1 de ratón. En el Ejemplo 1 se describe el aislamiento y clonaje del gen del receptor Sigma-1 de ratón y la construcción de un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa, mientras que en el Ejemplo 2 se describe la transfección de células ES de ratón y la generación de ratones mutantes deficientes en el receptor Sigma-1 murino.

## **EJEMPLO 1**

### **Aislamiento y clonaje del gen del receptor Sigma-1 de ratón y construcción de un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa**

#### **1.1 Aislamiento del gen del receptor Sigma-1 de ratón**

A partir de las secuencias publicadas del cDNA y del gen del receptor Sigma-1 de ratón [8] se diseñaron cuatro oligonucleótidos con el objetivo de aislar y clonar dicho gen. Las características de dichos oligonucleótidos, denominados MS1, MS2, MS3 y MS4, se detallan en la Tabla I. Las posiciones relativas de estos oligonucleótidos, respecto a las secuencias publicadas del cDNA y del gen de ratón, se representan esquematizadas en la Figura 1.

Tabla I

Oligonucleótidos utilizados para clonar el gen del receptor Sigma-1 de ratón

Oligo-nucleótido	Secuencia de DNA (5'→3')	Posición relativa respecto al gen [AF030199]	Posición relativa respecto al cDNA [AF030198]
MS1	SEQ.ID.NO: 1	2567-2584	-
MS2	SEQ.ID.NO: 2	3437-3458	113-134
MS3	SEQ.ID.NO: 3	3726-3708	277-259
MS4	SEQ.ID.NO: 4	5683-5664	1132-1113

Con dichos oligonucleótidos se obtuvieron fragmentos específicos de DNA del tamaño esperado a partir de DNA genómico y RNA total de ratón de las cepas NMRI y BALB/C, utilizando protocolos de PCR y RT/PCR habituales [9]. Se utilizaron inicialmente las parejas de oligonucleótidos MS1/MS3 y MS2/MS4 que produjeron, mediante PCR sobre DNA genómico, fragmentos de 1160 y 2246 pares de bases (pb), respectivamente. Además, a partir de RNA total, mediante RT-PCR se clonó el cDNA correspondiente al fragmento de 1020 pb a partir del par de oligonucleótidos MS2/MS4. Los fragmentos de DNA obtenidos fueron subclonados en el vector plasmídico Bluescript KS+ (Stratagene), usando métodos habituales [9]. En la Figura 1 se describen los plásmidos obtenidos con secuencias del cDNA y del gen. En particular se describe el plásmido **pmcS1/N**, que corresponde al fragmento cDNA de 1020 pb, obtenido a partir de los oligonucleótidos MS2/MS4, que posteriormente fue usado para la obtención de clones genómicos del gen del receptor Sigma-1 de ratón.

La clonación, por PCR y por RT/PCR, de los diferentes fragmentos genómicos y de cDNA correspondientes al gen del receptor Sigma-1 de ratón proporcionó sondas genéticas específicas para ser utilizadas en el aislamiento de clones genómicos intactos de una genoteca de ratón. Dado que el objetivo último reside en la obtención de un ratón mutante para este gen se debe procurar obtener clones secuencias isogénicas (esto es, de la misma cepa de ratón) con objeto de optimizar el proceso de recombinación homóloga en las células embrionales

pluripotentes ES [10]. Las células ES de ratón que se utilizaron, células ES R1 [11], provienen de un híbrido F1 de dos sub-cepas de ratón 129/Sv [129X1/SvJ x 129S1/SvJ]. Por ello, se decidió abordar el aislamiento de clones genómicos a partir de una genoteca comercial preparada a partir de DNA de ratones 129/Sv (Stratagene, Cat. Nr. #946313). Se analizaron  $1 \times 10^6$  clones recombinantes de la genoteca distribuidos en 6 placas grandes (Nunc, 243 mm x 243 mm, 530 cm<sup>2</sup>) a razón de 170.000 fagos por placa, aproximadamente. Se procedió a obtener dos réplicas consecutivas de cada placa en membrana de Nylon (Hybond-N, Amersham). Estas membranas fueron hibridadas con la sonda específica correspondiente al inserto del plásmido **pmcS1/N**, siguiendo protocolos habituales [9].

Inicialmente se identificaron nueve señales específicas (en ambos duplicados de las réplicas) y se procedió a purificar los bacteriófagos presentes en las placas que habían dado señal positiva, siguiendo protocolos habituales [9]. La utilización de los oligonucleótidos mencionados (MS1, MS2, MS3 y MS4) y el análisis mediante *Southern blot* permitió comprobar que cuatro de estos clones seleccionados ( $\lambda$ Sg1,  $\lambda$ Sg2,  $\lambda$ Sg5,  $\lambda$ Sg6) contenían la totalidad del gen del receptor Sigma-1 de ratón. En la Figura 2 se presenta el mapa de las secuencias colindantes al gen del receptor Sigma-1 de ratón obtenido a partir del solapamiento de los mapas de los cuatro clones de bacteriófagos mencionados. Se constató la obtención novedosa del mapa estructural de unas 30 kilobases (kb) circundantes al gen, lo cual excedía de la información publicada y depositada en las bases de datos (inferior a 7 kb, centradas alrededor del gen) [6]. Estas secuencias se subclonaron en plásmidos para poder ser utilizadas en la construcción del vector de la recombinación homóloga con selección positiva-negativa. En la Figura 3 se representan los diferentes clones originales obtenidos con secuencias genómicas correspondientes a secuencias situadas en la región 5' y 3' del gen.

### **1.2 Construcción del vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa (pHR53TK) para la inactivación por mutación del gen del receptor Sigma-1 en células ES de ratón**

Para la construcción del vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa denominado **pHR53TK** se utilizó, como plásmido de soporte e inicio de los sucesivos clonajes, el vector pHM2 [12] (8451 pares de bases, Base de datos GenBank, Código de acceso: X76682), el cual ya había sido utilizado con éxito en la preparación de vectores de recombinación homóloga que habían conducido a la inactivación efectiva de otros genes del ratón, véase, por ejemplo [13].

A partir del plásmido pmgS1 Eag6.7 (véase la Figura 3) se obtuvo, mediante digestión con el enzima de restricción *Bgl* II, un fragmento de 3,1 kb portador de la secuencia de homología 3' del gen del receptor Sigma-1 de ratón. Este fragmento *Bgl* II de 3,1 kb se insertó en el plásmido pHM2, previamente digerido con el mismo enzima, cuyo único sitio de corte para *Bgl* II se sitúa en la posición 8171, generándose el plásmido intermedio pHR3A, con un tamaño de 11,6 kb. Seguidamente, sobre el plásmido pHR3A se insertó, en el sitio único de corte para el enzima de restricción *Pml* I (posición 2259 relativa al plásmido pHM2), la secuencia de homología 5' del gen del receptor Sigma-1 de ratón, obtenida como un fragmento de 6,8 kb mediante digestión con los enzimas *Sal* I y *Sac* II a partir del DNA del bacteriófago  $\lambda$ Sg6 (Figura 2). La posterior fusión, previa conversión a extremos romos de las secuencias de DNA, del sitio *Sac* II (de la secuencia del gen del receptor Sigma-1 de ratón, posición 3356 de la secuencia AF030199) y *Pml* I (del vector pHR3A) permitió obtener la fusión transcripcional entre los primeros cuatro aminoácidos del gen del receptor Sigma-1 con el resto de aminoácidos del gen indicador *lacZ*, presente en el vector original pHM2 [12]. La adición de la secuencia de homología 5' del gen del receptor Sigma-1 permitió obtener el plásmido intermedio pHR53, el cual delimitaba exactamente los nucleótidos a suprimir (deleccionar) del gen entre las posiciones 3356 (*Sac* II) y 5263 (*Bgl* II), relativas a la secuencia original del gen depositada en GenBank AF030199. En efecto, esto producía la eliminación de 1907 nucleótidos, los cuales incluyen la práctica totalidad de secuencias codificantes para el gen del receptor Sigma-1 de ratón, con la excepción de los primeros cuatro aminoácidos. En la Figura 4 se representan gráficamente los límites precisos de la secuencia cuya eliminación estaba prevista realizar a través de recombinación homóloga en células ES de ratón (Ejemplo 1.3).

En la Figura 5 se puede observar la posición relativa de las secuencias de homología 5' y 3', de 6,8 y 3,1 kb de tamaño y presentes en el vector pHR53, respecto al solapamiento de 30 kb previamente descrito. Estas secuencias de homología 5' y 3' a su vez delimitan la zona del gen del receptor Sigma-1 a eliminar, de un tamaño de 1,9 kb.

Con objeto de verificar la presencia y fusión exacta de los fragmentos de DNA utilizados para la construcción del vector pHR53 se procedió a secuenciar los extremos de los mismos. En particular, se verificó la fusión transcripcional entre los primeros nucleótidos codificantes del gen del receptor Sigma-1 de ratón con la secuencia codificante para el gen indicador *lacZ*, tal y como se presenta en la Figura 6.

Finalmente, con objeto de obtener un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa sobre el que poder aplicar los procedimientos de selección positiva (gen de resistencia a neomicina, presente en el plásmido pHM2) combinados con los de selección negativa [14] (gen de resistencia a ganciclovir, timidina quinasa del virus del herpes simplex, HSV-TK, ausente en el plásmido pHM2 pero presente en el plásmido pPNT [15]) se procedió a clonar el cassette de expresión con el gen HSV-TK en el sitio de restricción *Not* I del plásmido pHR53 a través de una construcción intermedia en la que se obtuvo el gen HSV-TK en el vector pSX [12], generándose finalmente sobre éste último plásmido el vector pHR53TK de 20,8 kb de tamaño, cuyo mapa se muestra en la Figura 7. El plásmido pHR53TK ha sido depositado en la CECT con fecha 4 de octubre de 2002 y le ha correspondido el número de acceso CECT 5737.

## **EJEMPLO 2**

### **Generación de ratones mutantes deficientes en el gen del receptor Sigma-1 endógeno**

#### **2.1 Inactivación del gen del receptor Sigma-1 mediante recombinación homóloga en células ES de ratón y obtención de ratones quiméricos con dicha mutación**

Una vez construido el vector pHR53TK se linearizó mediante digestión con el enzima de restricción *Sal I* (Figura 7). A continuación, 20 µg del vector pHR53TK linearizado se utilizaron para transfectar  $9,6 \times 10^6$  células ES R1 [11] mediante electroporación (condiciones de electroporación: 500 µF, 250 V). A las 24 horas se inició el proceso de selección positiva mediante la adición de 300 µg/ml del antibiótico G418. A las 48 horas se adicionó la droga ganciclovir, para el proceso de selección negativa, hasta alcanzar una concentración final de 2 µM. Ocho días más tarde se procedió a identificar clones recombinantes independientes (resistentes a G418 y ganciclovir) que fueron subcultivados por separado. Todo el proceso se realizó en presencia de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) resistentes a G418 y del factor de crecimiento L.I.F. (*leucemia inhibitory factor* o factor de inhibición de la leucemia) para inhibir la diferenciación espontánea de las células ES pluripotentes. En todo momento se siguieron protocolos descritos en la literatura para el cultivo, transfección y manipulación de células ES de ratón [10] (información relativa al proceso de selección positiva-negativa se puede obtenerse, por ejemplo, en las patentes norteamericanas US 5.464.764, US 5.487.992, US 5.627.059 y US 5.631.153).

Se analizaron un total de 272 clones recombinantes de células ES de ratón mediante el procedimiento de *Southern blot*, descrito en la literatura [9]. Para ello se diseñaron dos sondas, una sonda 5' y otra sonda 3', alejadas de las zonas de homología del gen del receptor Sigma-1 de ratón incluidas en el vector pHR53TK con el objetivo de identificar dos polimorfismos en el tamaño de fragmentos de restricción. Así pues, mediante digestión con el enzima de restricción *Hind III* y utilizando la sonda 5' se podía distinguir el alelo salvaje (10,7 kb) del alelo mutante (19 kb) del gen del receptor Sigma-1 de ratón. De igual manera, mediante digestión con el enzima de restricción *EcoR I* y utilizando la sonda 3' se podía distinguir el alelo salvaje (13,7 kb) del alelo mutante (11,9 kb) del gen del receptor Sigma-1 de ratón. En la Figura 8 se indica el diseño experimental utilizado para diferenciar el alelo mutante del alelo salvaje del gen del receptor Sigma-1 de ratón.

De los 272 clones de células ES independientes analizados 12 (es decir, un 4,4%) presentaron los polimorfismos esperados utilizando la sonda 5' y la sonda 3'

(Figura 8). En la Figura 9 se muestra el resultado de los análisis mediante *Southern blot* del DNA genómico correspondiente a estos 12 clones de células ES.

Seguidamente se seleccionaron 4 clones recombinantes positivos de células ES independientes con el objeto de proceder a la generación de los ratones quiméricos (quimeras) correspondientes, mediante la técnica de agregación de mórulas, utilizando procedimientos descritos en la literatura [10], [11]. Las condiciones experimentales para la agregación de las células ES recombinantes (en número promedio de 10) con embriones en fase de 8-células (mórulas) de la cepa de ratón CD-1 comprendían el empleo de un 4% de medio condicionado de células ES en el proceso de agregación.

Usando estas condiciones se identificaron 11 quimeras supervivientes, obtenidas a partir de 19 quimeras inicialmente identificadas a término entre los 40 fetos que lograron progresar en su gestación a partir de 382 embriones agregados y transferidos. En la Tabla II aparece, de forma resumida el proceso de agregación utilizado.

**Tabla II**

**Agregación de mórulas (embriones de ratón de 8 células de la cepa CD-1) con los clones de células ES recombinantes positivos**

Nº embriones agregados	Nº embriones transferidos (% agregados)	Nº embriones gestados (% transferidos)	Nº fetos a término	Nº quimeras identificadas	Nº quimeras supervivientes
399	382 (95,7%)	71 (18,6%)	40	19	11

Las once quimeras supervivientes obtenidas correspondían a dos clones de células ES independientes, el clon #8 y el clon #175, siguiendo las recomendaciones incluidas en los protocolos habituales de generación de quimeras, que exigen la obtención de la mutación por lo menos a partir de dos clones independientes para evitar problemas inherentes a un determinado clon que pudieran generar un fenotipo



anómalo del ratón mutante [10].

Seguidamente se evaluó la transmisión por línea germinal de la mutación mediante cruces de las quimeras respectivas con hembras de la cepa receptora CD-1, cuyo pelaje albino es netamente distinguible del pelaje pigmentado característico de las cepas 129Sv de las que derivan las células ES R1 utilizadas en el proceso de recombinación homóloga [11].

En la Tabla III se describen los resultados de los análisis de transmisión del fenotipo pigmentado (asociado al genotipo presente en las células ES) realizados sobre las 11 quimeras identificadas.

**Tabla III**

**Quimeras obtenidas para la mutación en el gen del receptor Sigma-1. Análisis de la transmisión por vía germinal del genotipo presente en las células ES mediante cruces con hembras de ratón albinas CD-1**

Quimera	Clon ES	Sexo	% Quimerismo	% Transmisión Línea Germinal	Crías F1 pigmentadas en cruces con CD-1 / totales
1	#175	Macho	70%	100%	71/71
2	#175	Macho	5%	0%	0/130
3	#8	Macho	65%	100%	91/91
4	#8	Macho	20%	0%	0*
5	#8	Hermafrodita	40%	0%	0**
6	#175	Macho	50 %	0%	0/30
7	#175	Macho	100%	0%	0*
8	#8	Macho	70%	100%	27/27
9	#8	Macho	70%	100%	8/8
10	#8	Macho	10%	0%	0/28
11	#8	Macho	25%	0%	0/38

(\*) Sin tapones vaginales (estéril)

(\*\*) Tapones vaginales no productivos (estéril)

Los análisis de transmisibilidad demostraron que cuatro quimeras independientes (1 derivada del clon #175 y 3 derivadas del clon #8) fueron capaces de transmitir eficazmente (al 100 %) el genotipo de las células ES a su descendencia, a través de la línea germinal. Estos animales F1 fueron utilizados para analizar la presencia del alelo mutante y, mediante cruces sucesivos, generar el correspondiente ratón mutante.

## **2.2 Obtención de ratones mutantes para el gen del receptor Sigma-1**

Una vez verificada la transmisión a línea germinal en cuatro de las once quimeras obtenidas (con individuos representantes de los dos clones ES recombinantes utilizados) por la presencia de pigmentación en las crías F1 obtenidas a partir de los cruces con ratones albinos CD-1 se verificó la presencia de alelos mutados del gen del receptor Sigma-1. La detección de pigmentación no garantiza la presencia del alelo mutado puesto que solamente un 50% heredará el alelo portador de la mutación, el 50% restante heredará el alelo salvaje, intacto, de las células ES originales. Por ello, y para la posterior identificación de individuos homocigotos mutantes y salvajes, se diseñaron dos tests analíticos mediante la técnica de PCR (PCR-Sigma y PCR-Neo, Figura 10), usando métodos habituales [9] que permitían identificar inequívocamente los tres genotipos, concretamente: homocigotos salvajes, heterocigotos (portadores de la mutación) y homocigotos mutantes (Véase la Tabla IV).

**Tabla IV**  
**Obtención de genotipo mediante PCR**

Genotipo	PCR-SIGMA	PCR-NEO
Homocigoto salvaje	+	-
Heterocigoto	+	+
Homocigoto mutante	-	+

La PCR-Sigma utiliza los oligonucleótidos MS1 y MS3 [Tabla I] que solamente pueden amplificar un fragmento de DNA específico de 1,16 kb cuando alguno de los dos alelos del gen del receptor Sigma-1 está intacto. De forma similar, la PCR-Neo emplea dos oligonucleótidos específicos e internos al gen que confiere resistencia a la neomicina (gen *neo*) [Neo 1 (SEQ. ID. NO: 5) y Neo 2 (SEQ. ID. NO: 6)], que amplifican un fragmento de DNA específico de 0,7 kb solamente si alguno de los dos alelos transporta la mutación inicialmente detectada en las células ES.

En la Tabla V se detalla la identificación de individuos heterocigotos entre los individuos obtenidos en la F1 resultante de cruces entre quimeras transmisoras y hembras CD-1. Solamente los individuos pigmentados fueron analizados mediante la PCR-Neo. La detección de la banda analítica de 0,7 kb indica que ese individuo es portador de la mutación en uno de los alelos del gen del receptor Sigma-1. Aproximadamente la mitad de los individuos pigmentados, en cada uno de los dos clones, corresponden a ratones chinchilla. La otra mitad son ratones agouti, el pelaje salvaje. De igual manera, un poco menos de la mitad de los individuos F1 pigmentados resultaron ser, en cada uno de los dos clones analizados, heterocigotos y por lo tanto portadores de la mutación.

**Tabla V**  
**Detección de individuos heterocigotos en los cruces entre quimeras y hembras CD-1**

Quimeras	Total individuos F1 pigmentados analizados por PCR	Heterocigotos (+/-) identificados (% total)	Heterocigotos con pelaje chinchilla	Heterocigotos con pelaje agouti (salvaje)
Clon ES #175	71	31 (43,7%)	14	17
Clon ES #8	112	51 (45,5%)	25	26

Una vez identificados suficientes individuos heterocigotos (de los dos sexos) de cada uno de los dos clones ES utilizados, se establecieron cruces entre estos individuos heterocigotos con el objetivo, según las leyes de la Genética Clásica (Mendel), de lograr detectar individuos mutantes (homocigotos para el alelo mutante) en la segunda generación (F2) resultante.

La obtención del genotipo de los animales F2 generados se basó en los dos tests analíticos por PCR (PCR-Sigma y PCR-Neo) anteriormente descritos (véase la Tabla IV). El resultado de estos cruces y los números totales de cada uno de los tres genotipos obtenidos en los individuos de la segunda generación se detallan en la Tabla VI.

**Tabla VI**

**Detección de individuos homocigotos en los cruces entre animales F1**

Clones	Total individuos F2 analizados por PCR	Individuos salvajes (+/+) identificados	Individuos heterocigotos (+/-) identificados	Individuos homocigotos mutantes (-/-) identificados
Clon ES #175	130	42	60	28
Clon ES #8	48	12	25	11

Según las leyes de Mendel el resultado del cruce entre dos individuos heterocigotos, con dos alelos distintos para un mismo locus, se distribuye como sigue: 25% de individuos salvajes (+/+), 50% de individuos heterocigotos (+/-) y 25%

de homocigotos mutantes (-/-). En la Tabla VII se comparan los resultados obtenidos en la F2 (Tabla VI) frente a los esperados, según las leyes de Mendel.

**Tabla VII**  
**Comparación entre resultados obtenidos y esperados en los individuos F2**

	Total individuos F2	Salvajes (+/+) (% total)	Heterocigotos (+/-) (% total)	Mutantes (-/-) (% total)
Clon ES #175 Resultados OBTENIDOS	130	42 (32,3%)	60 (46,2%)	28 (21,5%)
Clon ES #175 Resultados ESPERADOS	130	32,5 (25%)	65 (50%)	32,5 (25%)
Clon ES #8 Resultados OBTENIDOS	48	12 (25%)	25 (52,1%)	11 (22,9%)
Clon ES #8 Resultados ESPERADOS	48	12 (25%)	24 (50%)	12 (25%)

El análisis estadístico de estos datos da como resultado, en ambos casos, un valor  $\chi^2$  calculado inferior al tabulado para  $p=0,05$  y  $(3-1 = 2)$  2 grados de libertad ( $\chi^2 = 5,991$ ) [Clon ES #175  $\chi^2 = 3,785$ ; Clon ES #8  $\chi^2 = 0,125$ ] por lo que se puede concluir, que la distribución de genotipos se ajusta a la prevista según Mendel ( $p=0,05$ ). No es pues estadísticamente significativa la ligera disminución de mutantes identificados respecto a los valores teóricamente esperados.

Como conclusión adicional a este primer análisis se puede añadir que se obtienen, por igual, machos y hembras homocigotos mutantes. La distribución por sexos entre los homocigotos mutantes identificados se ajusta a lo esperable (50% de cada sexo), no observándose, por el momento desviaciones estadísticamente

significativas. En el caso del clon ES #175 de los 28 mutantes detectados 13 son machos, mientras que en el caso del clon ES #8 de los 11 mutantes detectados 4 son machos. Ambos valores se acercan a la normalidad y siguen la distribución esperada ( $p=0,05$ , grados de libertad=1,  $\chi^2$  calculado=3,841) [Clon ES #175  $\chi^2 = 0,143$ ; Clon ES #8  $\chi^2 = 0,818$ ].

Adicionalmente se ha observado que tanto las hembras como los machos homocigotos mutantes son fértiles, por lo que han podido obtenerse colonias de esta mutación estables. No se ha detectado manifestación externa ni observable que, aparentemente, distinga a los ratones mutantes de los ratones salvajes. No obstante, los ratones están siendo analizados pormenorizadamente para evaluar el efecto de la mutación en el gen del receptor Sigma-1 mediante paradigmas encaminados a dilucidar su participación en procesos de analgesia, adicción, depresión, psicosis y esquizofrenia usando métodos habituales en esta área de conocimiento [16].

La mutación se ha obtenido y analizado en dos fondos genéticos mixtos distintos (129Sv x CD-1 y 129Sv x C57BL/6J).

### **2.3 Análisis estructurales, de expresión y función, en ratones mutantes para el gen del receptor Sigma-1**

Una vez generados los ratones mutantes para el gen del receptor Sigma-1 de ratón se verificó la ausencia del gen (DNA), de expresión del mismo (RNA mensajero), de proteína y de actividad (función) para verificar que, en efecto, los ratones mutantes eran deficientes en el gen del receptor Sigma-1.

En primer lugar se analizó la presencia de los polimorfismos asociados a las sondas 5' y 3' que permiten detectar los alelos mutantes y salvajes de forma inequívoca. Para ello se analizó DNA genómico de ratones salvajes, heterocigotos y mutantes para el gen del receptor Sigma-1. El resultado del análisis por *Southern blot* se incluye en la Figura 11. Los resultados obtenidos permiten concluir, inequívocamente, la presencia del alelo mutante según el diseño experimental previsto.

En segundo lugar se evaluó la expresión del gen del receptor Sigma-1 en

diferentes órganos de ratones mutantes, heterocigotos y salvajes en los cuales el gen habitualmente está presente [5]. Para estos análisis de expresión se utilizó la técnica de *Northern blot*, siguiendo protocolos descritos en el área [9]. A continuación, en la Figura 12, se observa la ausencia de señal en aquellos carriles del gel que corresponden a RNA totales de animales homocigotos mutantes, y por lo tanto carentes del gen del receptor Sigma-1. En conclusión, no solamente no está el gen del receptor Sigma-1 sino que además es imposible encontrar RNA mensajeros (transcritos) que permitan documentar su expresión. En efecto, el ratón mutante no expresa el gen del receptor Sigma-1.

En tercer lugar se evaluó la expresión del gen del receptor Sigma-1 en cerebro de ratones mutantes, heterocigotos y salvajes mediante la localización de la proteína correspondiente en extractos proteicos por un anticuerpo policlonal específico. Para ello, se utilizó la técnica de *Western blot*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13, donde no se observan niveles detectables de proteína (receptor Sigma-1) en los extractos proteicos de cerebro procedentes de ratones mutantes homocigotos para el gen Sigma-1.

En cuarto lugar se evaluó la actividad (función) del receptor Sigma-1 de ratón mediante un ensayo de unión específica al ligando [ $^3$ H]-pentazocina. Brevemente, cerebros de ratones mutantes (-/-), heterocigotos (+/-) y salvajes (+/+) fueron homogeneizados y los homogeneizados se centrifugaron varias veces en distintas condiciones de velocidad para obtener la fracción membranaria. Posteriormente, se procedió a la incubación de muestras de la fracción membranaria obtenidas con el radioligando [ $^3$ H]-pentazocina en condiciones de unión óptima para este receptor (37°C, durante 130-170 minutos), filtración de las muestras, lavado de las muestras y lectura del conteo de radiactividad presente en el filtrado [22]. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14 y ponen de manifiesto la ausencia de actividad (función) en los ratones mutantes homocigotos.

En quinto lugar se evaluó la función del receptor Sigma-1 frente a paradigmas y protocolos de conducta y comportamiento conocidos. En este sentido no se han detectado diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento de los ratones mutantes frente a los salvajes en la siguiente lista de tests o paradigmas

analizados. Solamente se han observado diferencias estadísticamente significativas frente a ratones salvajes en la respuesta de hiperactividad (hipermotilidad) inducida por el ligando SKF-10047 (datos no mostrados).

### DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Un cultivo de *Escherichia coli* Top10F', denominado pHR53TK conteniendo el vector plasmídico pHR53TK ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Burjasot, Valencia (España), el 4 de octubre de 2002, correspondiéndole el número de acceso CECT 5737.

### BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Kaiser C., Pontecorvo M.J. & Mewshaw R.E. (1991) Sigma receptor ligands: function and activity. *Neurotransmissions* 7 (1): 1-5.
- 2.- Walker J.M., Bowen W.D., Walker F.O., Matsumoto R.R., De Costa B. & Rice K.C. (1990) Sigma receptors: biology and function. *Pharmacological Reviews* 42 (4): 355-402.
- 3.- Bowen W.D. (2000) Sigma receptors: recent advances and new clinical potentials. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 74: 211-218.
- 4.- Hanner M., Moebius F.F., Flandorfer A., Knaus H.G., Striessing J., Kempner E. & Glossmann H. (1996) Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian Sigma-1 binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 8072-8077.
- 5.- Kekuda R., Prasad P.D., Fei Y.-J., Leibach F.H. & Ganapathy V. (1996) Cloning and functional expression of the human type 1 Sigma receptor (hSigmaR1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229: 553-558.
- 6.- Seth P., Leibach F.H. & Ganapathy V. (1997) Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type I sigma receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241: 535-540.
- 7.- Seth P., Fei Y.-J., Li H.-W., Huang W., Leibach F.-H. & Ganapathy V. (1998) Cloning and functional characterization of a ? receptor from rat brain. *Journal of Neurochemistry* 70: 922-931.



- 8.- Prasad P.D., Hui W.L., Fei Y.-J., Ganapathy M.E., Fujita T., Plumley L.H., Yang-Feng T.-L., Leibach F.-H. & Ganapathy V. (1998) Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human Type I  $\beta$  receptor gene. *Journal of Neurochemistry* 70: 443-451.
- 9.- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1999. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & sons, Inc.
- 10.- A.L. Joyner (1999) "Gene Targeting. A practical approach" Second Edition. IRL Press, Oxford University Press.
- 11.- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8424-8.
- 12.- Kaestner KH, Montoliu L, Kern H, Thulke M & Schütz G (1994) "Universal  $\beta$ -galactosidase cloning vectors for promoter analysis and gene targeting". *Gene* 148: 67-70.
- 13.- Kaestner KH, Hiemisch H, Schutz G. Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol*. 1998 Jul;18(7):4245-51.
- 14.- Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*. 1989 Mar;5(3):70-6.
- 15.- Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*. 1991 Jun 28;65(7):1153-63.
- 16.- Jacqueline N. Crawley (2000) What's wrong with my mouse?. *Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*, Wiley-Liss, New York.
- 17.- Sambrook, Fitch and Maniatis, eds., (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- 18.- Crane MS (1999) Mutagenesis and cell transformation in cell culture. *Methods Cell Sci*. 21(4):245-253.
- 19.- Earnest D.J., Liang F.Q., DiGiorgio S., Gallagher M., Harvey B., Earnest B., Seigel G. (1999) Establishment and characterization of adenoviral E1A

immortalized cell lines derived from the rat suprachiasmatic nucleus. J. Neurobiol. Apr; 39(1):1-13.

20.- Schwartz B., Vicart P., Delouis C., Paulin D. (1991) Mammalian cell lines can be established *in vitro* upon expression of the SV40 large T antigen driven by a promoter sequence derived from the human vimentin gene. Biol. Cell. 73(1):7-14.

21.- Frederiksen K., Jat P.S., Valtz N., Levy D., McKay R. (1988) Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. Neuron. Aug; 1(6):439-448.

22.- DeHaven-Hudkins D.L., Fleissner L.C., Ford-Rice, F.Y. (1992) Characterization of the binding of [3H]-Pentazocine to sigma recognition sites in guinea pigs brain. European Journal of Pharmacology 227:371-378.

## REIVINDICACIONES

1. Un mamífero no humano mutante, deficiente en un receptor Sigma endógeno, cuyo genoma contiene una mutación que comprende una disrupción en un gen de un receptor Sigma endógeno, en donde dicha disrupción génica da lugar a un mamífero no humano mutante que carece de niveles detectables de receptor Sigma endógeno.

2. Mamífero no humano mutante según la reivindicación 1, en el que dicho mamífero no humano mutante es un mutante heterocigoto para dicha mutación.

3. Mamífero no humano mutante según la reivindicación 1, en el que dicho mamífero no humano mutante es un mutante homocigoto para dicha mutación.

4. Mamífero no humano mutante según la reivindicación 1, en el que dicho mamífero no humano es un ratón.

5. Mamífero no humano mutante según la reivindicación 1, en el que el genoma del mamífero no humano mutante comprende un transgén dentro de la mutación introducida en el gen del receptor Sigma-1 endógeno que comprende un gen que codifica para un marcador de selección positiva.

6. Mamífero no humano mutante según la reivindicación 5, en el que dicho transgén comprende el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*).

7. Mamífero no humano mutante según la reivindicación 1, en el que dicho receptor Sigma se selecciona entre un receptor Sigma de tipo 1 (Sigma-1) y un receptor Sigma de tipo 2 (Sigma-2)

8. Mamífero no humano mutante según la reivindicación 1, en el que dicho mamífero no humano mutante es un ratón mutante, deficiente en el receptor Sigma-

1 endógeno, homocigoto para el gen del receptor Sigma-1 de ratón, fértil, cuyo genoma contiene una disrupción en dicho gen que comprende el gen *neo*.

9. Un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa, que comprende:

- a) una primera región de homología, situada en el extremo 5' de una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva, en donde dicha primera región de homología tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una primera secuencia de un gen de un receptor Sigma;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva;
- c) una segunda región de homología, situada en el extremo 3' de dicha secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva, en donde dicha segunda región de homología tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una segunda secuencia de dicho gen del receptor Sigma, estando dicha segunda secuencia del gen del receptor Sigma en una posición 3' respecto a dicha primera secuencia del gen del receptor Sigma en un gen Sigma endógeno tipo salvaje; y
- d) una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección negativa.

10. Vector según la reivindicación 9, en el que dicho gen del receptor Sigma se selecciona entre el gen del receptor Sigma de tipo 1 (Sigma-1) y el gen del receptor Sigma de tipo 2 (Sigma-2).

11. Vector según la reivindicación 9, en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección positiva comprende el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*).

12. Vector según la reivindicación 9, en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador de selección negativa comprende el gen de la timidina quinasa (*tk*) del herpes simples (HSV).

13. Vector según la reivindicación 9, identificado como pHR53TK, depositado en la CECT con el número de acceso nº CECT 5737.

14. Una célula hospedadora cuyo genoma contiene un gen de un receptor Sigma endógeno transfectada con un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, deficiente en un receptor Sigma endógeno.

15. Célula según la reivindicación 14, en la que dicha célula hospedadora cuyo genoma contiene un gen de un receptor Sigma endógeno se selecciona entre una célula diferenciada que normalmente expresa el producto del gen del receptor Sigma y una célula embrional pluripotente.

16. Célula según la reivindicación 14, que comprende un alelo del gen del receptor Sigma-1 mutado.

17. Una célula aislada a partir de un mamífero no humano mutante, deficiente en un receptor Sigma endógeno, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o de su descendencia.

18. Célula según la reivindicación 17, que comprende uno o los dos alelos del gen del receptor Sigma mutados.

19. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, propagada y, opcionalmente, inmortalizada.

20. La descendencia de un mamífero no humano mutante, deficiente en un receptor Sigma endógeno, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

21. Un procedimiento para la obtención de un mamífero no humano mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la introducción de una disrupción funcional en un gen de un receptor Sigma endógeno presente en el genoma de una célula, por recombinación homóloga en dicha célula entre un alelo de un gen de un receptor Sigma endógeno y un vector de recombinación homóloga con selección positiva-negativa según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, la selección de los homólogos recombinantes mediante la técnica de selección positiva-negativa, la introducción de dichos homólogos recombinantes en embriones, su implantación en mamíferos hembra receptoras pseudogestantes y su desarrollo a término, la selección de las quimeras capaces de transmitir eficazmente el genotipo de los homólogos recombinantes a su descendencia a través de la línea germinal; el cruzamiento de dichas quimeras con mamíferos no humanos tipo salvaje para obtener mutantes heterocigotos para la disrupción del gen del receptor Sigma endógeno y, si se desea, el cruzamiento de dichos mutantes heterocigotos entre sí para obtener mutantes homocigotos.

22. Empleo de un mamífero no humano mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como animales control para la realización de ensayos *in vivo*.

23. Empleo de un mamífero no humano deficiente en el receptor Sigma-1, o de una línea celular deficiente en el receptor Sigma-1, para evaluar compuestos potencialmente útiles destinados a

- prevenir y/o tratar desórdenes del sistema nervioso central;
- prevenir y/o tratar alteraciones de la memoria;
- prevenir y/o tratar condiciones de estrés;

prevenir y/o tratar condiciones de adicción a drogas;  
producir analgesia; o  
producir neuroprotección.

24. Empleo de un mamífero no humano deficiente en el receptor Sigma-2, o de una línea celular deficiente en el receptor Sigma-2, para la validación y/o desarrollo de fármacos diseñados para el diagnóstico o tratamiento del cáncer; la prevención y/o el tratamiento de procesos degenerativos, o para prevenir, reducir o aliviar los efectos secundarios asociados con la administración de agentes neurolépticos.

25. Un método para determinar el efecto de un compuesto a ensayar sobre un mamífero no humano deficiente en un receptor Sigma endógeno, que comprende poner en contacto un mamífero no humano mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con dicho compuesto a ensayar y detectar la presencia o ausencia de un cambio fisiológico en dicho mamífero no humano mutante en respuesta al contacto con dicho compuesto.

26. Un método para determinar el efecto de un compuesto a ensayar sobre un mamífero no humano deficiente en un receptor Sigma endógeno, que comprende administrar dicho compuesto a ensayar a un mamífero no humano mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; administrar dicho compuesto a ensayar a un mamífero no humano control que expresa un receptor Sigma endógeno funcional; y observar si dicho compuesto produce un efecto sobre el fenotipo en dicho mamífero no humano mutante cuando se compara con el mamífero no humano control.

27. Un método para determinar el efecto de un compuesto sobre células que expresan un receptor Sigma y sobre células que no expresan dicho receptor Sigma, que comprende introducir un compuesto a ensayar en una población de células, o en un homogeneizado de las mismas, en donde dichas células son células aisladas o establecidas a partir de un mamífero no humano mutante según cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 8, administrar dicho compuesto a ensayar a una población de células de mamífero no humano control, o a un homogeneizado de las mismas, que expresa un receptor Sigma funcional, y observar o analizar si dicho compuesto a ensayar produce un efecto sobre la expresión de dicho receptor Sigma en las células de dicho mamífero no humano mutante cuando se compara con células de mamífero no humano control.



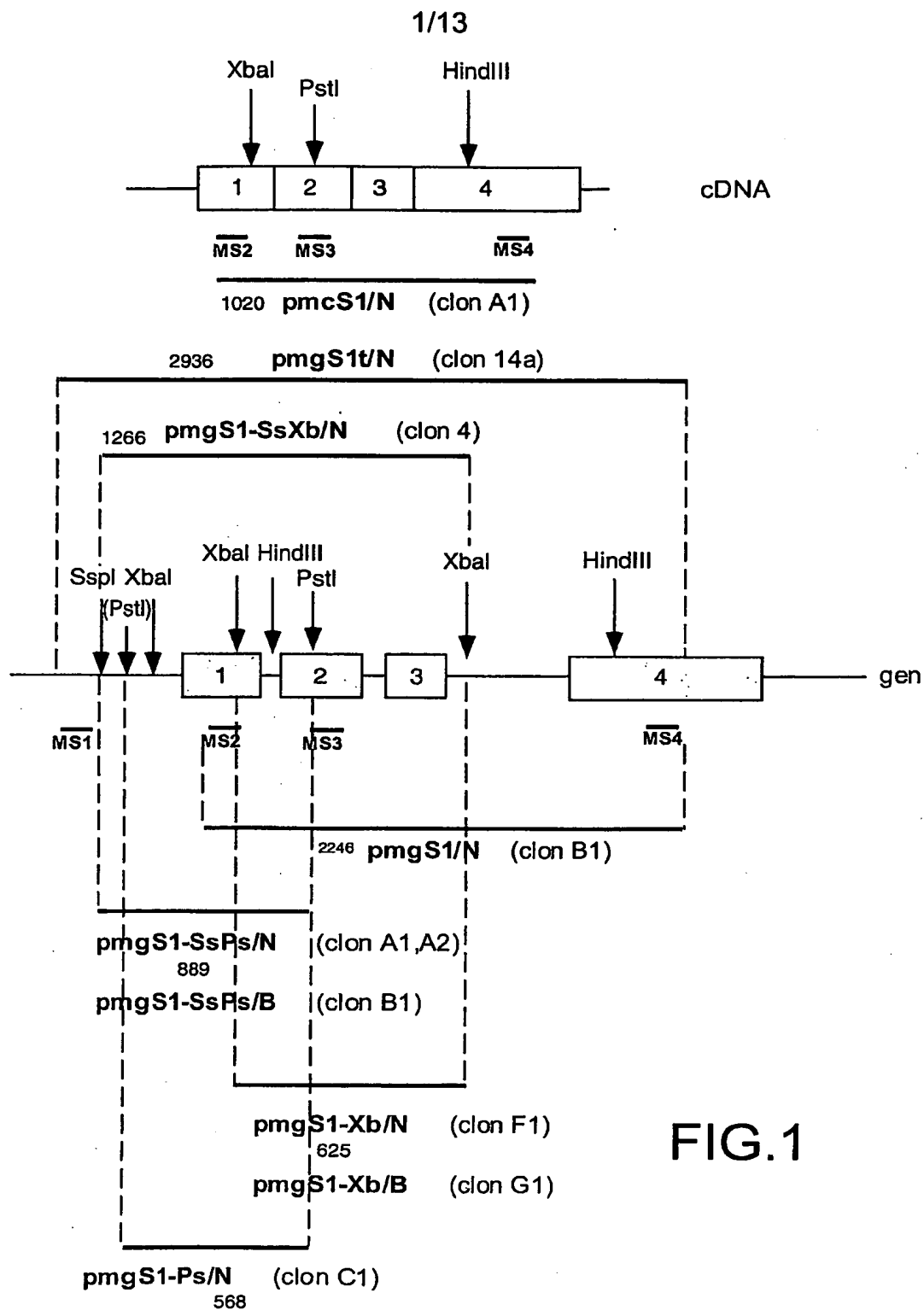
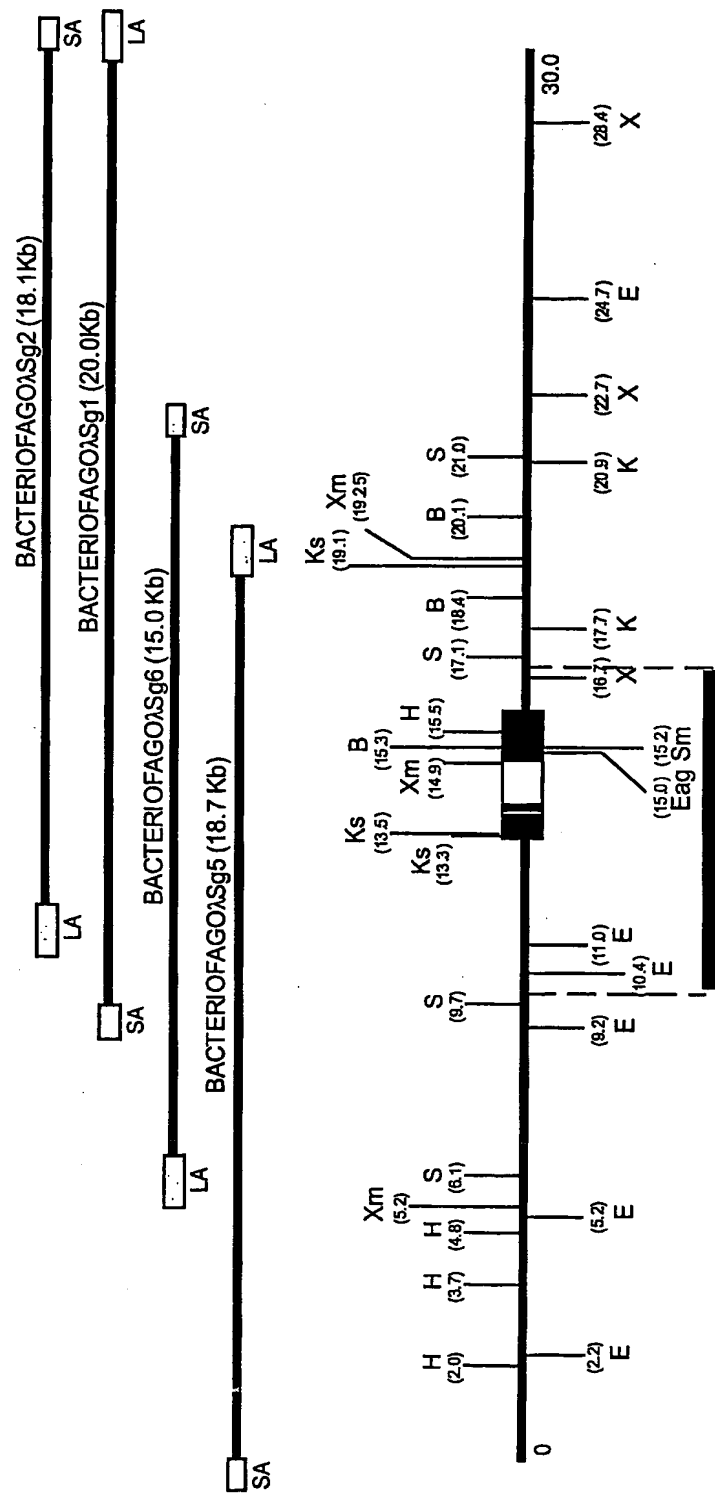


FIG.1



Secuencia publicada (GenBank AF030 199)

FIG.2

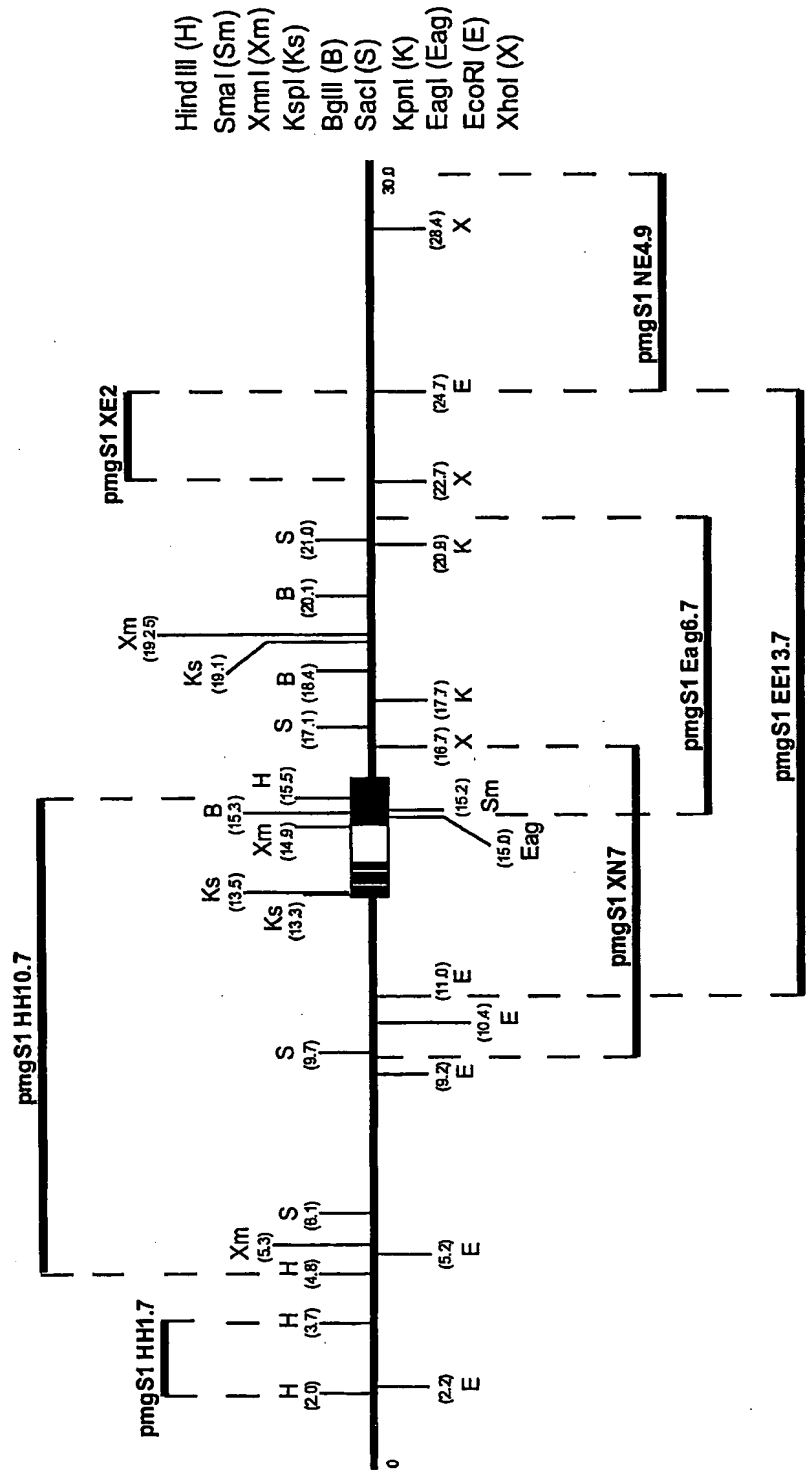


FIG.3

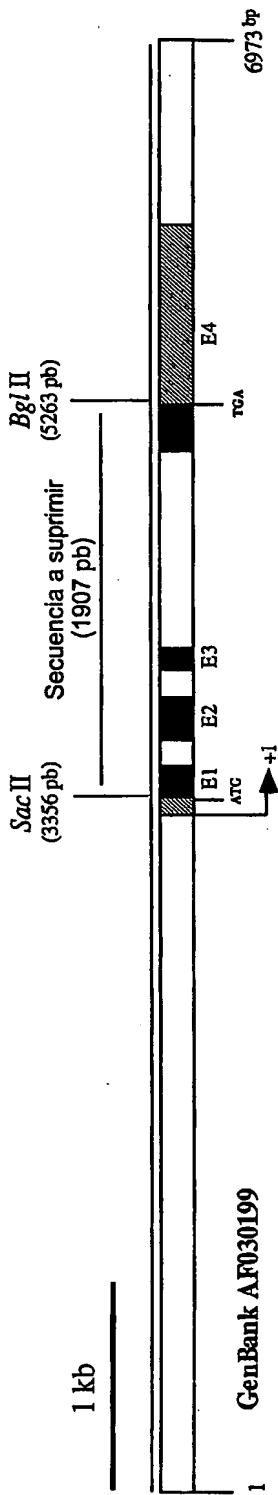


FIG.4

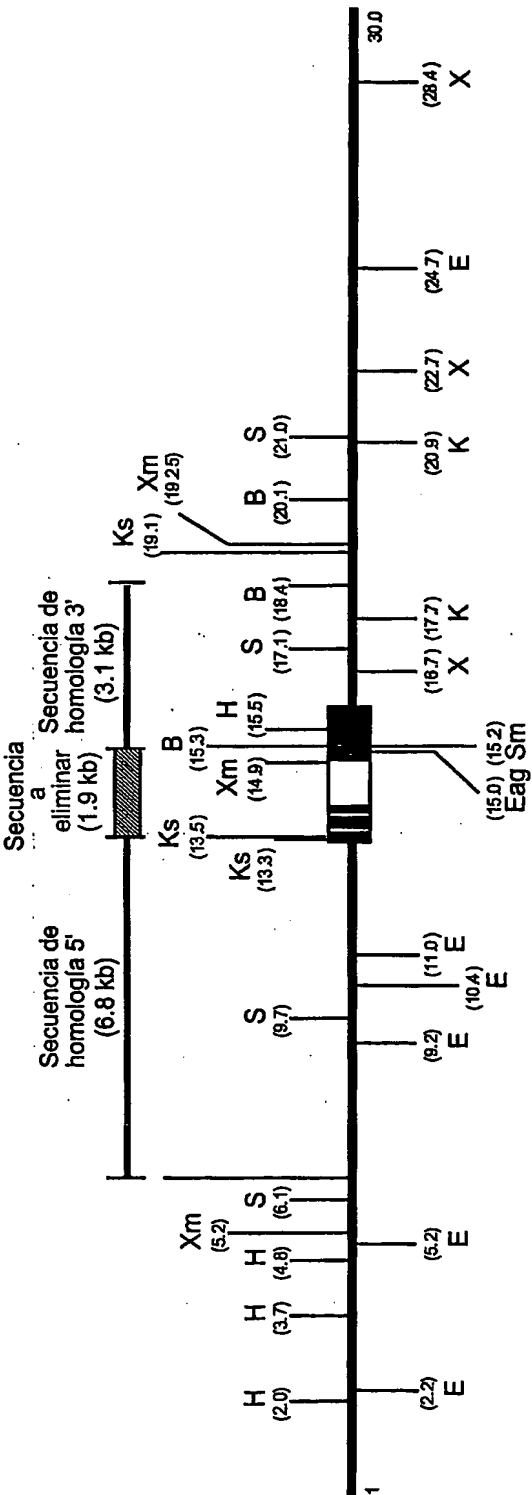


FIG.5

5/13

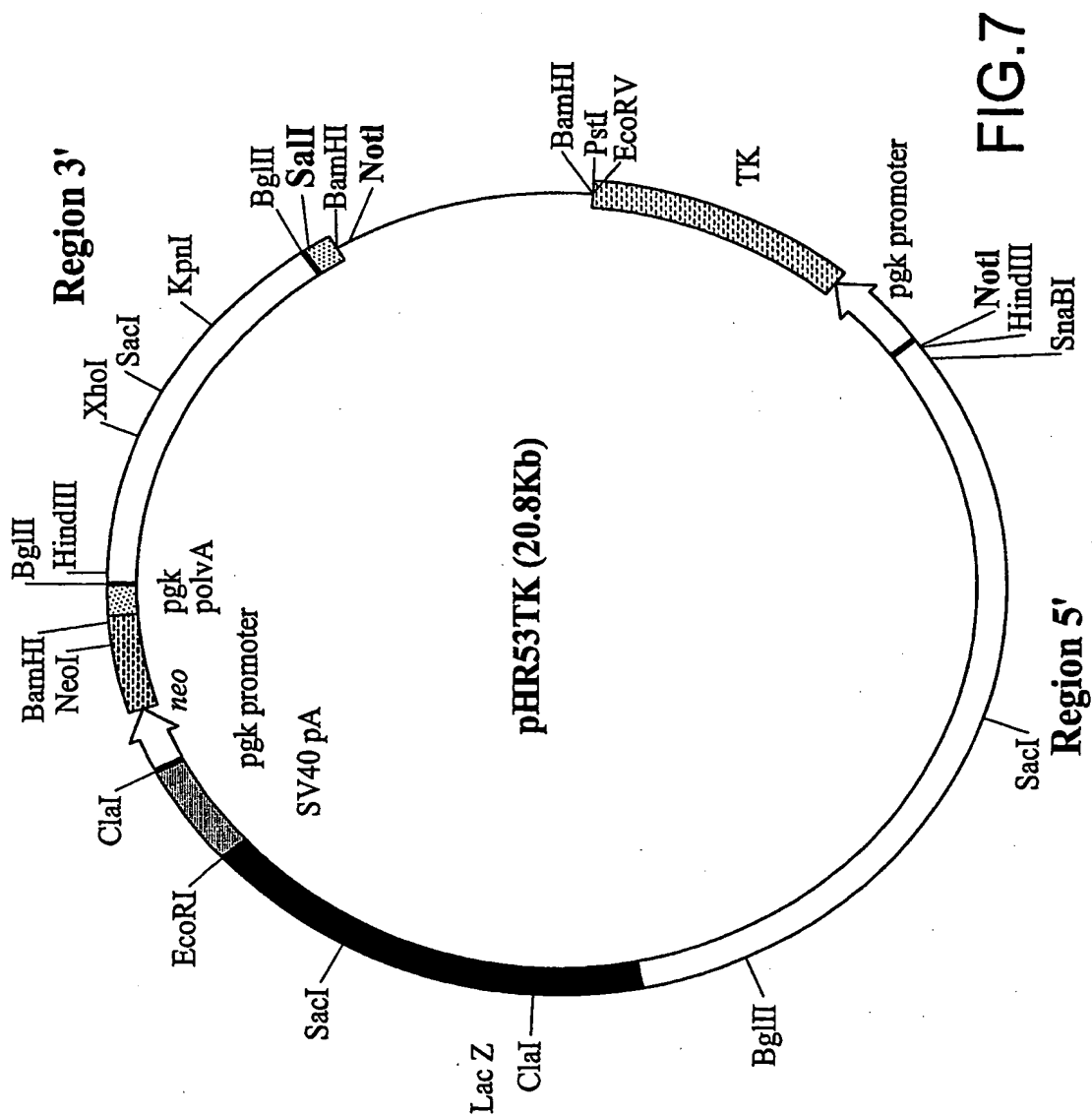
		Sac II		PmlI														
gtt	ggt	gcc	agg	ctg	ccc	gct	aga	<b>atg</b>	ccg	tgg	gcc	GTG	ACC	ATG	TCG	TTT	ACT	TTG
								<b>met</b>	<b>pro</b>	<b>trp</b>	<b>ala</b>	val	thr	met	ser	phe	thr	leu

Fragmento 5' de homología del gen Sigma I de ratón

gen lacZ del plásmido pHM2

FIG.6

6/13



**FIG.7**

7/13

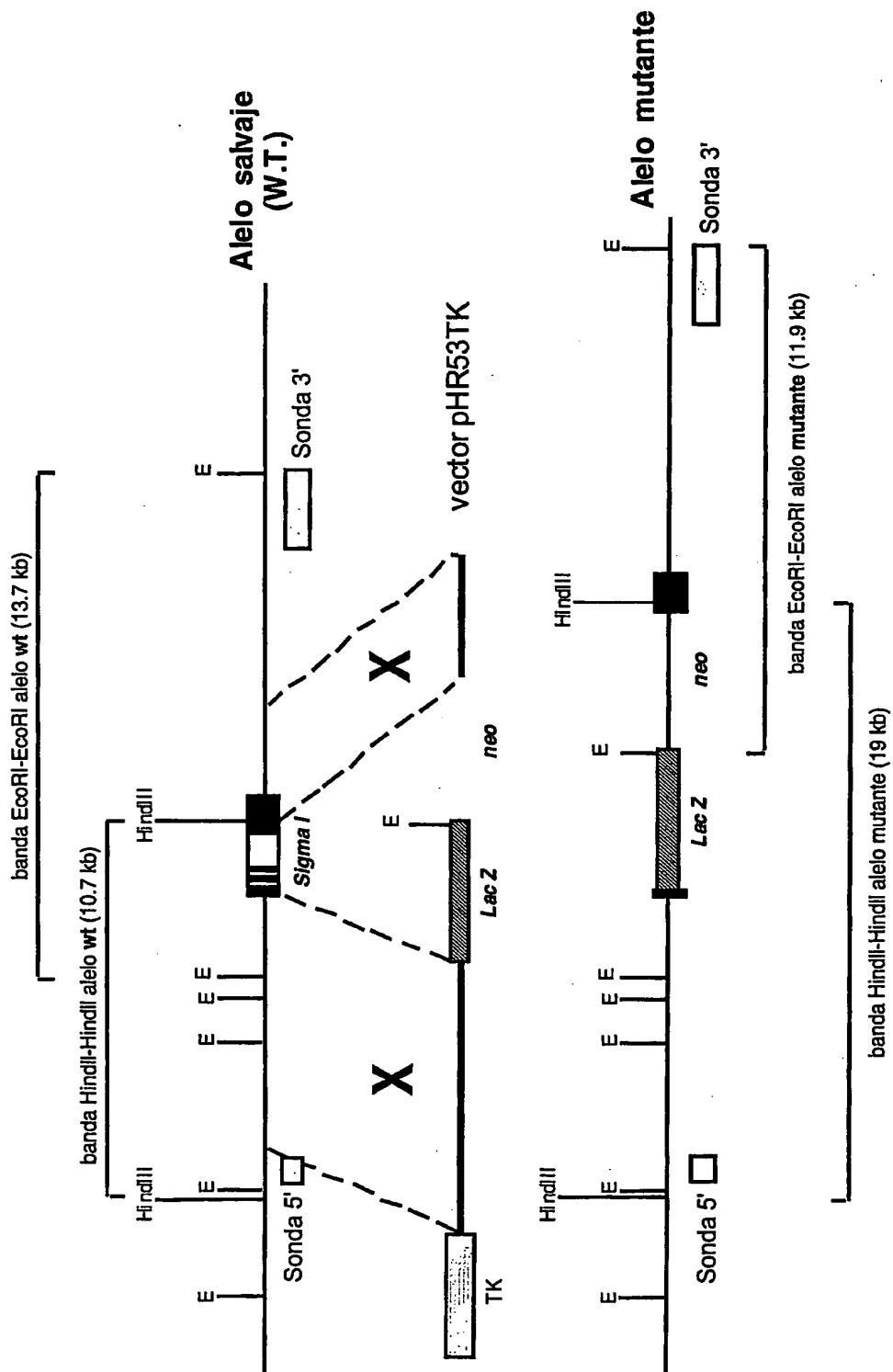


FIG.8

8/13

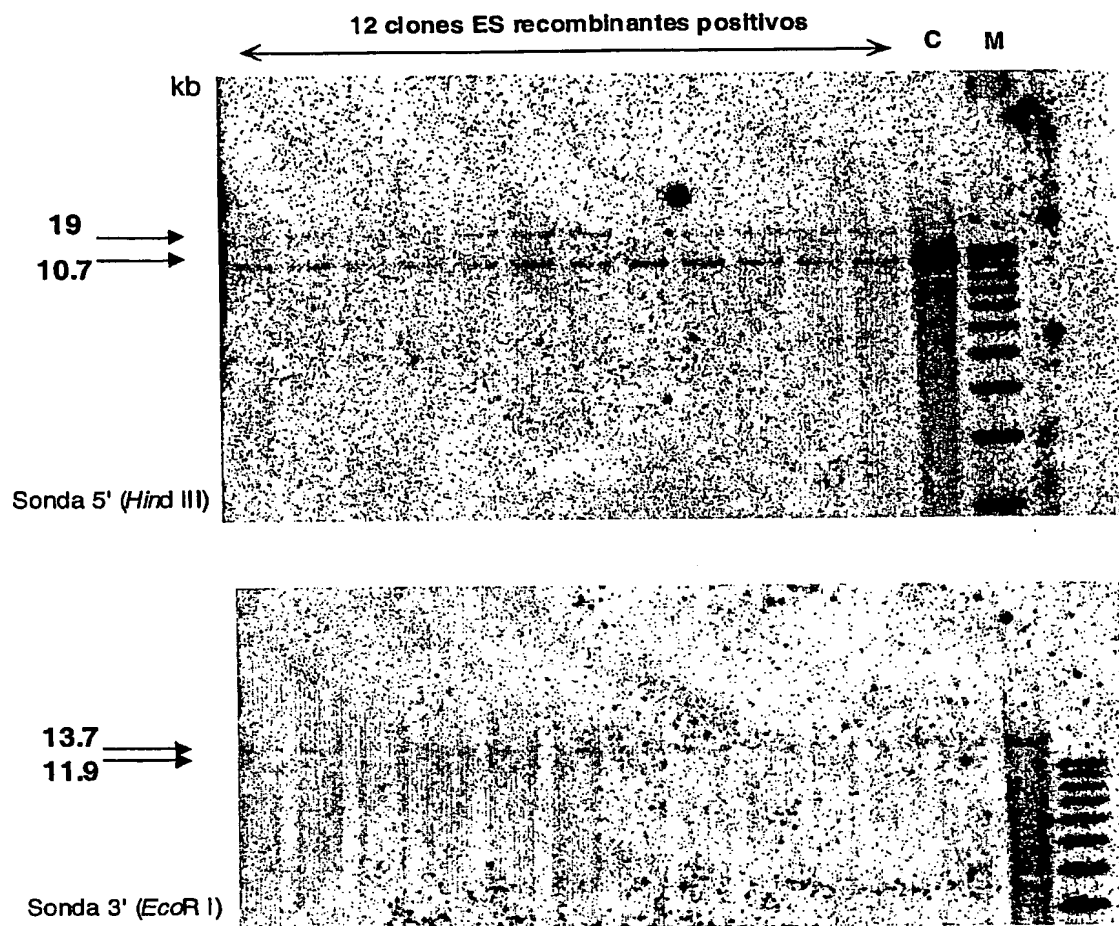


FIG.9



9/13

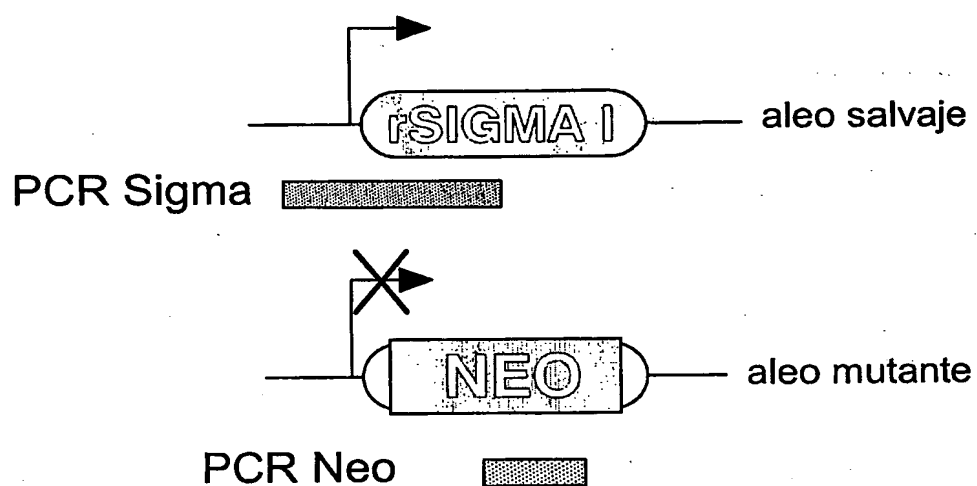


FIG.10

10/13

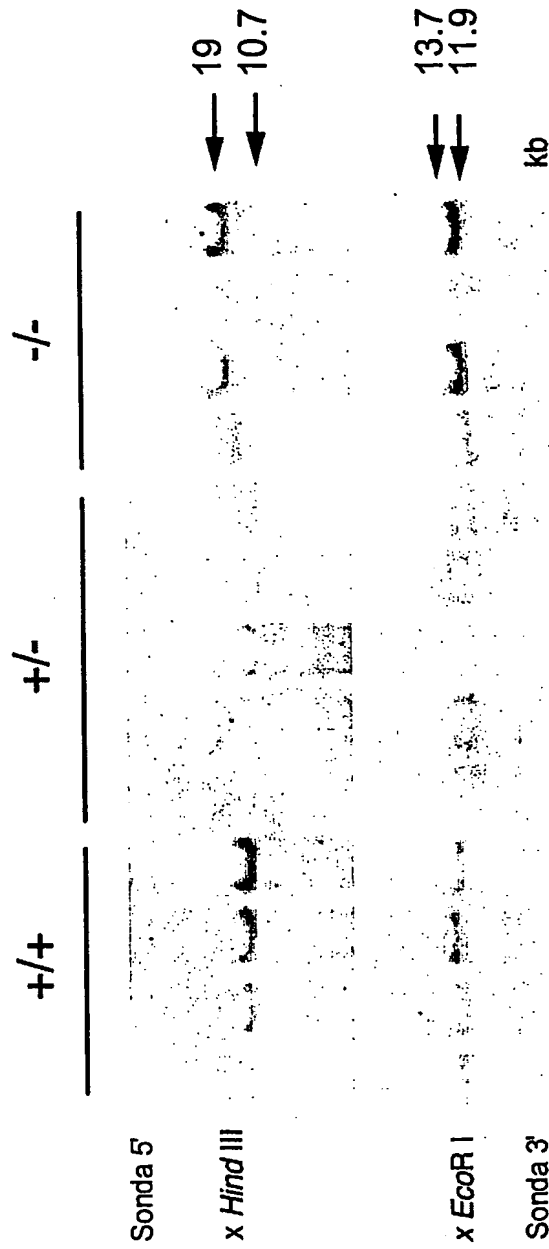


FIG.11

11/13

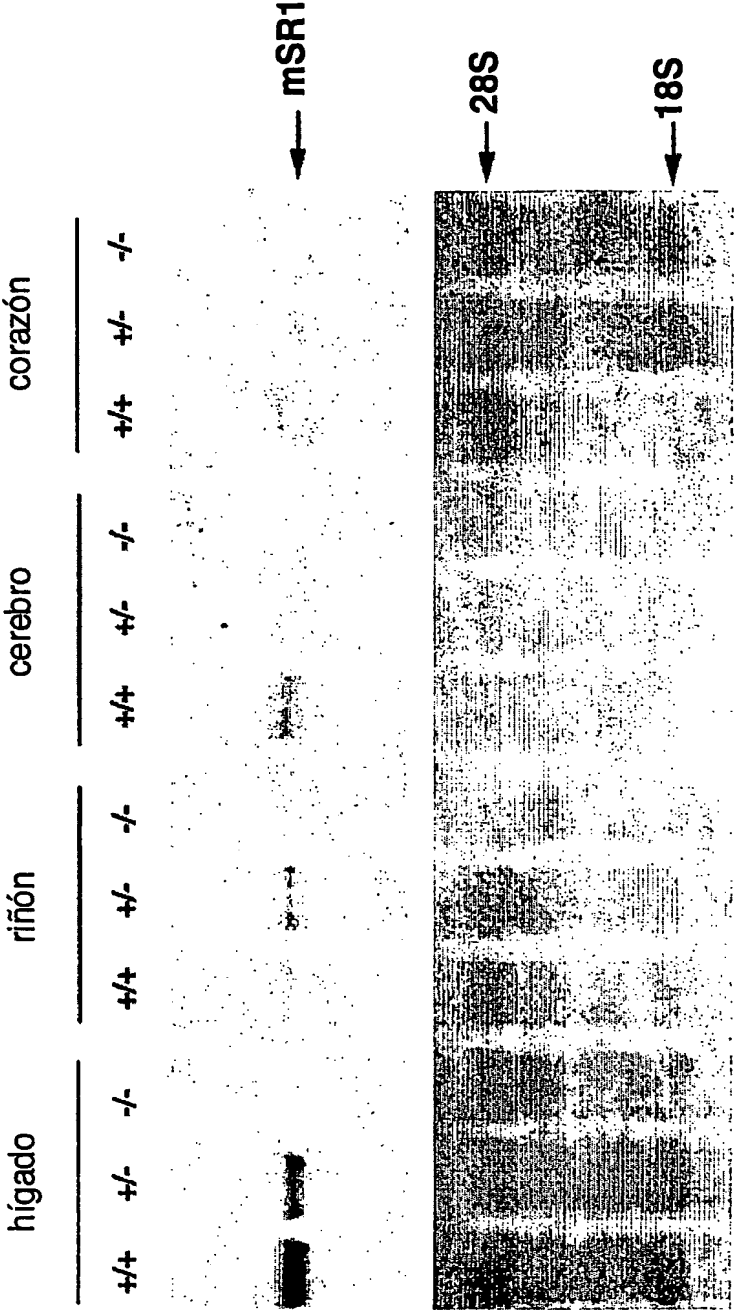


FIG.12

12/13

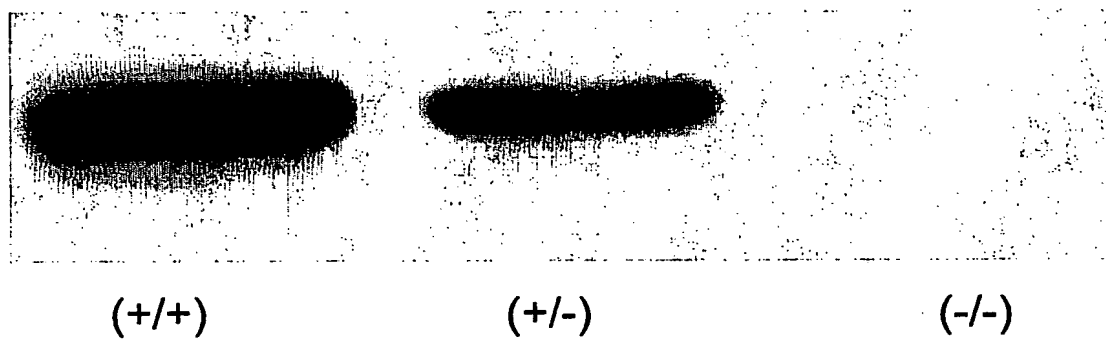


FIG.13

13/13

**Ratones Knock-out SIGMA 1**  
**machos**

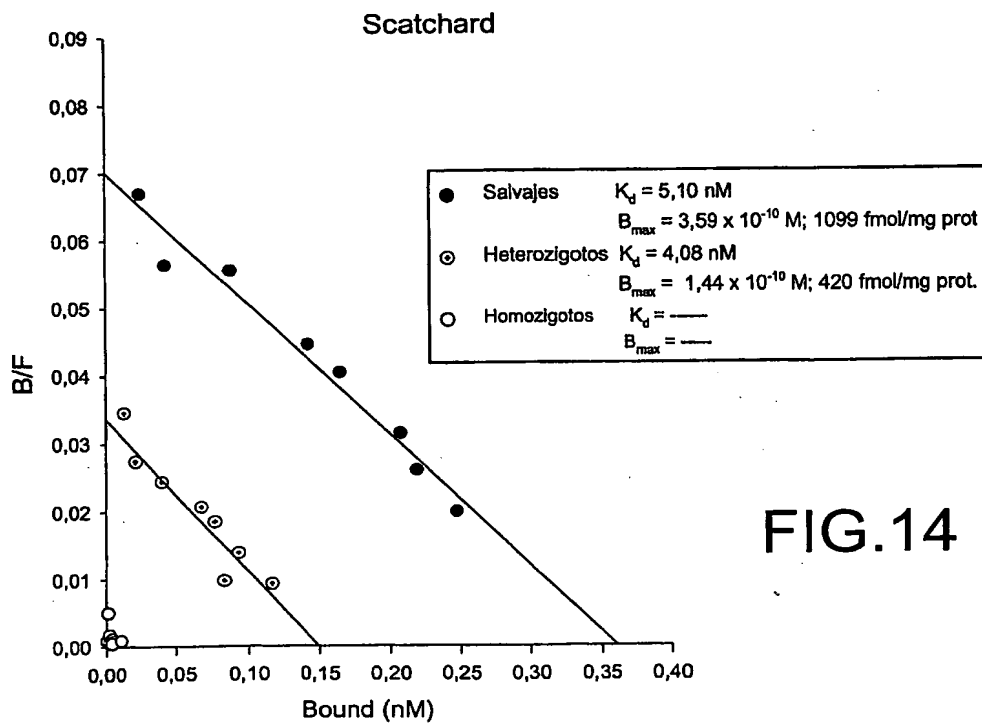
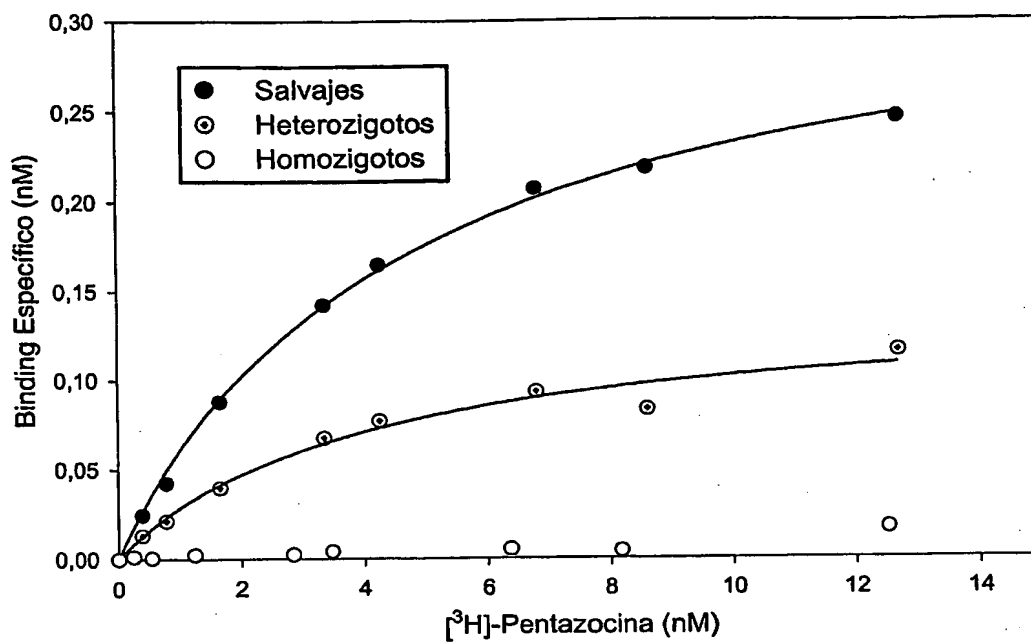


FIG.14

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.

<120> Mamíferos no humanos mutantes deficientes en receptores Sigma y sus aplicaciones

<160> 6

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador MS1

<400> 1

aattttgctc ccctcctc

18

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador MS2

<400> 2

gcactcaaaa cttcgtcttc tc

22

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador MS3

<400> 3

cgttcacaaa tacccactg

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador MS4

<400> 4

agctcctctt tcccttcacc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador Neo 1

<400> 5

gctattcggc tatgactggg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador Neo 2

<400> 6

gaaggagata gaaggcgaatg

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES03/00624

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**IPC 7** A01K67/027, C12N5/10, C12N15/12, C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**IPC 7** A01K67 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SETH P., ET AL., Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type I sigma receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 241:535-540. <b>Quoted in the application</b>	1-12,14-27
Y	SETH P., ET AL., Cloning and functional characterization of a $\sigma$ Receptor from rat brain. Journal of Neurochemistry, 1998, 70: 922-931. <b>Quoted in the application</b>	1-12,14-27
Y	BABINET C. ET AL., Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian technology. An. Acad. Bras. Cienc., 2001 (3) pp. 365-383	1-12,14-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**17 MAR 2004 (17.03.04)**

Date of mailing of the international search report

**23 APR 2004 (23.04.04)**

Name and mailing address of the ISA/

**S.P.T.O.**

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES03/00624

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5487992 (CAPECCHI ET AL.) 30 January 1996	1-12,14-27
Y	CAPECCHI ET AL., Altering the genome by homologous recombination. Science 1999 Jun 16; 244(4910):1288-92	1-12, 14-27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES03/00624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US5487992	30-01-1996	US5464764	07-11-1995
		US5627059	06-05-1997
		US5631153	20-05-1997
		US6204061	20-03-2001
		US6689610	10-02-2004

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ES03/00624

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> A01K67/027, C12N5/10, C12N15/12, C12N15/63  
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> A01K67 C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

WPI, EPODOC, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	SETH P., ET AL., Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type I sigma receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 241:535-540. Citado en la solicitud	1-12,14-27
Y	SETH P., ET AL., Cloning and functional characterization of a $\sigma$ Receptor from rat brain. Journal of Neurochemistry, 1998, 70: 922-931. Citado en la solicitud	1-12,14-27
Y	BABINET C. ET AL., Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian technology. An. Acad. Bras. Cienc., 2001 (3) pp. 365-383	1-12,14-27

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 17 marzo 2004

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

23 ABR 2004

23.04.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

Marta Hernández Cuéllar

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
n° de fax +34 91 3495304

n° de teléfono + 34 91 3495545

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES03/00624

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	US 5487992 (CAPECCHI ET AL.) 30 enero 1996	1-12,14-27
Y	CAPECCHI ET AL., Altering the genome by homologous recombination. Science 1999 Jun 16; 244(4910):1288-92	1-12, 14-27

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES03/00624

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US5487992	30-01-1996	US5464764	07-11-1995
		US5627059	06-05-1997
		US5631153	20-05-1997
		US6204061	20-03-2001
		US6689610	10-02-2004